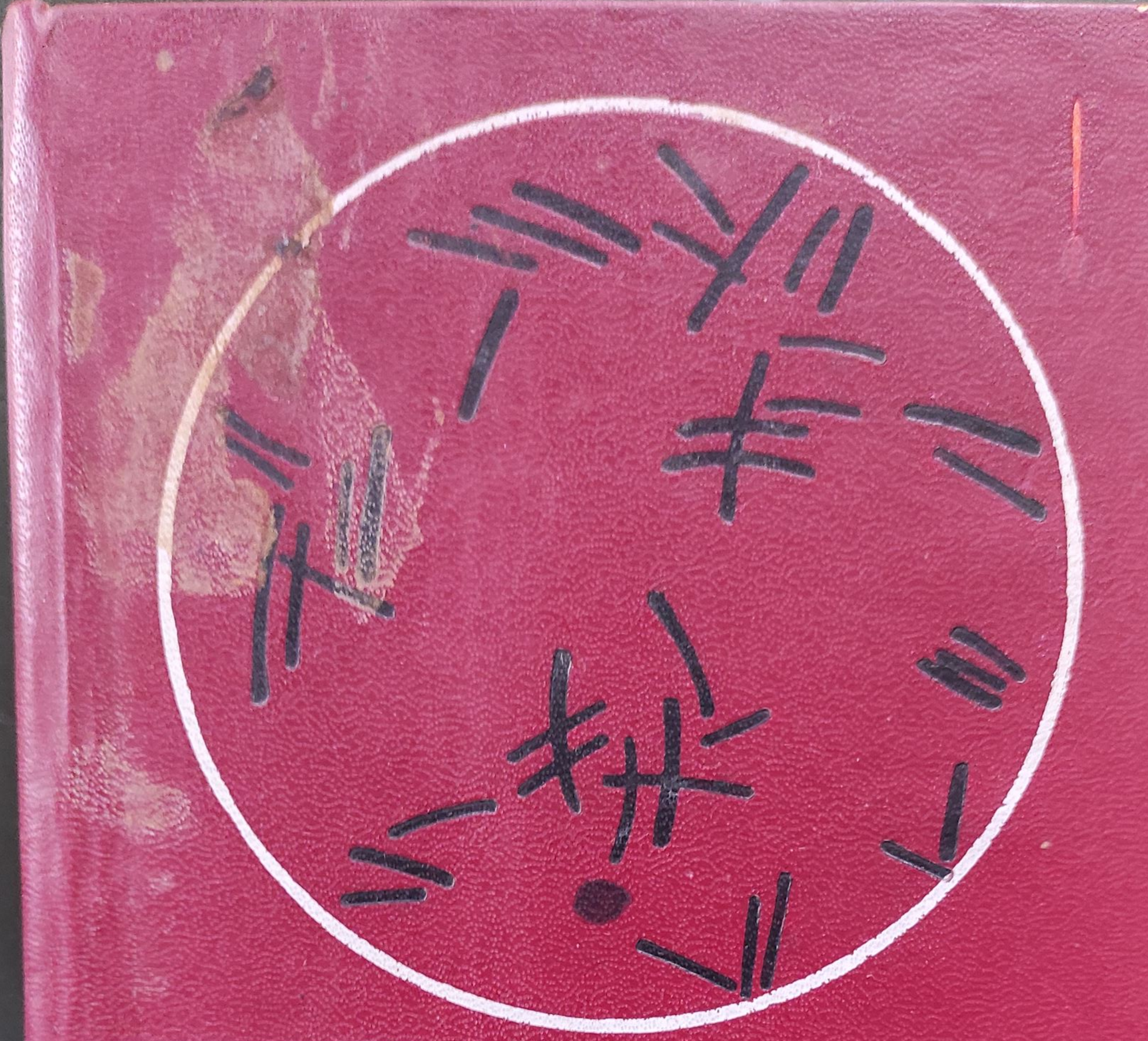


153 304

escu Valeria Bica-Popii

Bacteriologie veterinară aplicată

393379

HELGOMAR RĂDUCĂNESCU

VALERIA BICA POPI

Bacteriologie veterinară aplicată

PREFAȚĂ

Lucrarea de față și-a propus ca scop înarmarea tuturor celor interesați cu cunoștințele de bază necesare practicii bacteriologice. Prima parte a lucrării este de bacteriologie propriu-zisă. Capitolele introductive cuprind o prezentare sintetică a celor mai importante momente de istoric, caracterele generale care delimitează bacteriile de restul lumii microbiene și o sumară trecere în revistă a principalelor însușiri ale bacteriilor folosite drept criterii taxonomice. În continuare sînt descrise, folosind elemente de determinator, principalele specii bacteriene care interesează patologia veterinară. În a doua parte sînt cuprinse tehnicile bacteriologice, insistîndu-se asupra celor curente. Sînt prezentate și principiile unor metode moderne, care n-au intrat încă în practica bacteriologică veterinară din țara noastră, deoarece nu au încă o aplicație curentă, formînd obiectul unor foarte înguste specializări. Noi le-am menționat totuși în scopul informării cititorului asupra stadiului actual de tehnicitate în bacteriologie și a înțelegerii direcțiilor spre care tinde investigația bacteriologică în momentul de față.

Va părea poate curios faptul că publicăm o bacteriologie„ separată de complexul de discipline incluse curent în

atotcuprinzătorul termen generic de „Microbiologie", dar considerăm că această formulă răspunde mai adecvat cerinţelor actuale ale practicii de laborator.

Intenţia noastră a fost de a ne adresa unui cerc cît mai larg de cititori care se ocupă cu bacteriologia veterinară, în primul rînd medicilor şi tehnicienilor care lucrează în laboratoarele judeţene veterinare, dar şi celor din teren interesaţi în probleme de etiologie a bolilor, apoi bacteriologilor din alte domenii, care în activitatea lor au contingenţe cu speciile bacteriene patogene pentru animale, după cum şi studenţilor facultăţilor de Medicină Veterinară.

La elaborarea lucrării am căutat să îmbinăm maxima ei utilitate cu o cît mai largă accesibilitate. În ce măsură am reuşit să ne materializăm aceste intenţii am dori s-o aflăm de la cei care au citit cartea şi au încercat să se servească de ea în munca de laborator.

AUTORII

CUPRINS

PARTEA I

Specii bacteriene patogene pentru animale şi caracterele utile identificării lor

Obiectul bacteriologiei 11
Momente importante din istoricul bacteriologiei . . . 11
Momente şi personalităţi importante în dezvoltarea bacteriologiei medicale şi veterinare în România 14
Locul bacteriilor în cadrul lumii microbiene şi caracteristicile lor 15
Însuşirile morfo-fiziologice care servesc la individualizarea bacteriilor ca entităţi taxonomice 15
Sistematica (taxonomia) bacteriană 28
Clasa Schizomycetes 30
Ordinul Pseudomonadales 30
Familia Pseudomonadaceae 30
Genul Pseudomonas 30
Genul Aeromonas 35
Familia Spirillaceae 36
Genul Vibrio 36
Ordinul Eubacteriales 42
Familia Enterobacteriaceae 42
Genul Escherichia 42
Genul Aerobacter 47
Genul Klebsiella 48
Genul Paracolobactrum 51
Genul Erwinia 52
Genul Serratia 53
Genul Proteus 54
Genul Salmonella 57
Genul Shigella 65
Diferenţierea enterobacteriaceelor 67
Familia Brucellaceae 68
Genul Pasteurella 68
Genul Bordetella 79
Genul Haemophilus 80
Genul Actinobacillus 83

Genul Moraxella 88
Genul Sphaerophorus 89
Genul Brucella 93
Familia Micrococcaceae 100
Genul Staphylococcus 100
Genurile Micrococcus, Gaffkya și Sarcina . . 107
Familia Lactobacillaceae 107
Genul Streptococcus 107
Genul Diplococcus 114
Genul Lactobacillus 115
Familia Corynebacteriaceae 116
Genul Corynebacterium 116
Genul Erysipelothrix 120
Genul Listeria 123
Familia Bacillaceae 127
Genul Bacillus 127
Genul Clostridium 136
Ordinul Actinomycetales 154
Familia Mycobacteriaceae 154
Genul Mycobacterium 154
Familia Actinomycetaceae 165
Genul Actinomyces 165
Genul Nocardia 168
Ordinul Spirochaetales 171
Familia Treponemataceae 171
Genul Borrelia 171
Genul Leptospira 174
Ordinul Mycoplasmatales 179
Familia Mycoplasmataceae 179
Genul Mycoplasma 179
Ordinul Rickettsiales 189
Familia Rickettsiaceae 189
Genul Coxiella 189
Genul Ehrlichia 192
Genul Cowdria 192
Familia Chlamydiaceae 193
Genul Chlamydia (Miyagawanella, Bedsonia, Pararicket-
tsia) 193

PARTEA A II-A

Metode de examinare și identificare a bacteriilor

Măsuri de protecția muncii în laboratorul de bacteriologie . 199
Metode de sterilizare 201

Sterilizare prin agenţi fizici 202
Sterilizare prin căldură uscată 202
Sterilizare prin căldură umedă 203
Sterilizare prin raze ultraviolete 205
Filtrarea 206
Sterilizare prin agenţi chimici 209
Norme generale privind recoltarea, păstrarea şi transportul diferitelor materiale patologice în vederea examenului microbiologic 209
Tehnica examinării caracterelor morfologice şi tinctoriale ale bacteriilor 211
Examenul microscopic 211
Examenul bacteriilor în stare vie 213
Examenul bacteriilor în frotiuri colorate 214
Tehnica executării frotiului 214
Metode de colorare a celulelor vegetative în frotiuri 218
Metode de colorare a sporului 227
Metode de colorare a capsulei 228
Metode de colorare a cililor 230
Determinarea dimensiunilor bacteriilor 231
Metode de cultivare a bacteriilor 233
Generalităţi privind mediile de cultură 233
Clasificarea mediilor de cultură 234
Medii de cultură 235
Medii de cultură uzuale pentru bacteriile aerobe . . 235
Medii pentru cultivarea brucelelor 240
Medii pentru izolarea bacteriilor Gram pozitive nesporulate (streptococi, stafilococi, micrococi, bacilul rujetului) 240
Medii pentru izolarea şi examinarea unor proprietăţi biochimice şi de patogenitate ale stafilococilor . . . 241
Medii pentru diagnosticul diferenţial al enterobacteriaceelor 243
Medii pentru izolarea salmonelelor 245
Medii de diagnostic diferenţial între germenii din genurile Escherichia şi Salmonella 248
Mediul selectiv pentru izolarea speciei Vibrio fetus . . 249
Medii pentru cultivarea leptospirelor 250
Medii pentru cultivarea micoplasmelor 250
Medii pentru cultivarea bacteriilor anaerobe 251
Izolarea bacteriilor în culturi 253
Tehnica însămînţării bacteriilor 253
Tehnica însămînţării din organe 254
Tehnica transplantării 257
Tehnici de separare în culturi pure a bacteriilor din materiale care conţin o floră mixtă 259
Particularităţi privind izolarea bacteriilor anaerobe . 261

Examenul caracterelor culturale 266
Metode de punere în evidenţă a mobilităţii bacteriilor pe baza aspectului cultural 267
Metodele de conservare a tulpinilor bacteriene în colecţii 269
Determinarea numărului de bacterii dintr-un produs . 272
Tehnica examinării caracterelor metabolice sau biochimice 276
Reacţii de punere în evidenţă a activităţii enzimatice faţă de glucide şi polialcooli 277
Reacţii de punere în evidenţă a activităţii enzimatice faţă de substanţe organice ce conţin azot . . . 281
Teste prin care se pun în evidenţă fermenţii bacterieni oxidanţi sau reductori 288
Teste prin care se pune în evidenţă posibilitatea metabolizării anumitor substanţe 290
Teste biochimice complexe 292
Tehnica pregătirii unor soluţii necesare pentru medii de cultură şi teste biochimice 297
Determinarea sensibilităţii germenilor faţă de substanţe cu acţiune antibacteriană 299
Determinarea sensibilităţii germenilor faţă de antibiotice 299
Testarea sensibilităţii bacteriilor faţă de sulfamide . . 304
Metode de apreciere a activităţii antimicrobiene a substanţelor antiseptice şi dezinfectante şi a toxicităţii acestor substanţe pentru ţesuturi 304
Metode folosite în studiul fenomenelor de bacteriofagie . 308
Metode de punere în evidenţă a bacteriocinelor . . . 314
Reacţiile serologice 315
Reacţii de seroaglutinare 316
Reacţii de seroprecipitare 322
Imunoelectroforeza 328
Reacţia de fixare a complementului 329
Imunofluorescenţa 340
Reacţia de seroneutralizare 345
Conservarea serurilor 346
Examenul patogenităţii bacteriilor 346
Tehnica infecţiei experimentale (bioproba) . . . 348
Tehnici de determinare a DLM şi DL_{50} 353
Animalele germfree şi gnotobiologia 363
Norme generale ale conduitei stabilirii unui diagnostic bacteriologic 363
Index alfabetic 370
Bibliografie 378

B.C.U. „N. Bălcescu" IAȘI

PARTEA
I

SPECII BACTERIENE PATOGENE PENTRU ANIMALE ȘI CARACTERELE UTILE IDENTIFICĂRII LOR

OBIECTUL BACTERIOLOGIEI

Bacteriologia este ramura microbiologiei, care se ocupă cu studiul bacteriilor. Ea are o parte teoretică — bacteriologia generală — care se ocupă cu studiul proprietăților comune tuturor bacteriilor, indiferent de nișa lor ecologică, și mai multe ramuri aplicative.

Dintre acestea menționăm: bacteriologia medicală, veterinară, agricolă, alimentară, marină, industrială etc. Fiecare din ele se ocupă de studiul speciilor bacteriene care au implicații în domeniile respective.

Obiectul bacteriologiei veterinare îl constituie studiul speciilor bacteriene capabile să provoace îmbolnăviri la animalele domestice.

MOMENTE IMPORTANTE DIN ISTORICUL BACTERIOLOGIEI

— Antony van Leeuwenhoeck descoperă lumea microbiană cu ajutorul microscopului construit de el. Descrierea primelor bacterii se găsește în lucrarea „Arcana naturae ope microscopiorum detecta“ comunicată

la Societatea Regală de Biologie din Londra în 1675 și tipărită la Delft în 1695.

— Fridrich Müller (în perioada 1773—1786) face prima încercare de clasificare a bacteriilor, subliniind faptul că nu toate microorganismele sînt identice. Creează două genuri: *Vibrio* și *Monas*.

— Ferdinand Cohn în 1872 creează termenul de bacterie și împreună cu Ehrenberg desprind acest grup de microorganisme din regnul animal și argumentează încadrarea lui în regnul vegetal, pe baza prezenței peretelui celular.

— Louis Pasteur (1822—1892) face mai multe descoperiri hotărîtoare pentru dezvoltarea ulterioară a microbiologiei și anume: stabilește natura microbiană a fermentațiilor și, prin analogie cu ceea ce se întîmplă în cazul fermentațiilor, fundamentează teoria microbiană a infecțiilor; infirmă definitiv teoria generației spontane cu dovezi experimentale incontestabile; descoperă și descrie mai multe specii bacteriene (stafilococii, streptococii, vibrionul septic); prepară mai multe vaccinuri de mare eficiență în profilaxia unor infecții microbiene la om și animale (vaccinul antiholeric aviar, anticărbunos și antirabic).

— Robert Koch (1843—1910) formulează celebrele postulate prin care stabilește în ce condiții un microb poate fi considerat agentul etiologic al unei infecții; descoperă și descrie mai multe specii bacteriene (bacilul tuberculozei, vibrionul holeric); descoperă starea de sensibilitate crescută a cobailor tuberculoși față de tuberculină (prima observație a unui fenomen de alergie); realizează mai multe inovații în tehnica bacteriologică, cum sînt introducerea în practică a mediilor de cultură solide și punerea la punct a conduitei de izolare a bacteriilor în culturi pure.

— Christian Gram introduce în 1884 metoda de colorare care îi poartă numele şi care a rămas pînă astăzi tehnica de bază pentru examenele bacteriologice curente.

— Perioada 1880—1900 este marcată prin izolarea şi descrierea celor mai importante microorganisme care produc infecţii la om şi animale: Escherich, 1882 — *Escherichia coli;* Nicolaier şi Kitasato, 1884 — *Clostridium tetani*, Bruce, 1887 — *Brucella melitensis;* Nocard şi Roux, 1898 — *Mycoplasma mycoides.* În 1892, Ivanovski descoperă virusurile, microorganisme cu însuşiri morfo-biologice inferioare bacteriilor, iar în 1898 Löffler şi Frosch primul virus animal (virusul febrei aftoase).

Mecinikov în 1892 descoperă fenomenul de fagocitoză şi fundamentează teoria celulară a imunităţii.

— Babeş şi Lepp în 1889, apoi Behring şi Kitasato 1890 prepară primele seruri imune şi le introduc în practica terapiei şi profilaxiei antiinfecţioase.

— Prin descoperirea salvarsanului de către Ehrlich în 1910 şi a sulfamidelor de către Domagk în 1932 se pun bazele chimioterapiei.

— Prin descoperirea penicilinei de către Fleming în 1929, urmată de descoperirea a numeroase alte antibiotice, se rezolvă practic problema tratamentului pentru un număr mare de boli infecţioase şi îndeosebi al celor produse de bacterii.

— Avery, pe baza cercetărilor întreprinse pe specia *Diplococcus pneumoniae* în 1944, stabileşte rolul determinant al ADN în ereditate. Această descoperire a marcat un moment deosebit de important pentru dezvoltarea geneticii moleculare moderne.

— Dezvoltarea chimiei a făcut posibilă lărgirea considerabilă a studiilor de fiziologie bacteriană; apariţia microscopului electronic (firma Siemens în perioada

1930—1940) a creat un nou şi vast cîmp cercetărilor de morfologie; introducerea metodelor de lucru cu izotopi radioactivi a contribuit la elucidarea a numeroase probleme privind infecţia şi imunitatea.

MOMENTE ŞI PERSONALITĂŢI IMPORTANTE ÎN DEZVOLTAREA BACTERIOLOGIEI MEDICALE ŞI VETERINARE ÎN ROMÂNIA

— Victor Babeş creează şcoala de bacteriologie românească. Printre descoperirile sale mai importante menţionăm incluziile Babeş-Negri din 1887 în turbare, serurile imune (împreună cu Lepp în 1889), babeziile, corpusculii de volutină din citoplasma bacilului difteriei (corpusculii Babeş-Ernst). Babeş a elaborat peste 1 000 lucrări ştiinţifice, 25 monografii şi, împreună cu Victor Cornil, este autorul primului tratat de bacteriologie apărut în 1883. Paralel cu activitatea ştiinţifică, a desfăşurat şi o bogată activitate didactică, organizatorică şi obştească, conturîndu-se ca o figură luminoasă de savant patriot.

— Dintre savanţii care ulterior au dezvoltat în mod strălucit şcoala de microbiologie medicală românească trebuie menţionate personalităţile lui Ioan Cantacuzino (1863—1934), Constantin Ionescu-Mihăeşti (1883—1962), Mihai Ciucă (1883—1969), Dumitru Combiescu (1887—1961), iar în domeniul virusologiei Constantin Levaditi (1874—1953) şi Stefan S. Nicolau (1896—1967).

— Paul Riegler (1867—1936), elev al lui Victor Babeş, este fondatorul şcolii româneşti de microbiologie veterinară. Introduce diagnosticul bacteriologic în practica veterinară, organizează producţia preparatelor bio-

logice de uz veterinar, fondînd Institutul Pasteur; desfăşoară o bogată activitate ştiinţifică, remarcîndu-se lucrările privind bacilul morvei şi începînd din 1900 conduce catedra de Anatomie Patologică şi Microbiologie la şcoala de Medicină Veterinară.

— Alexandru Vechiu (1890—1954) a fost continuatorul lui Riegler la Institutul Pasteur şi la catedra de Microbiologie. A fost printre primii care au adaptat virusul pestei porcine pe iepure. A desfăşurat o activitate multilaterală.

— Alexandru Ciucă (1880—1972) a fost elev al lui Cantacuzino şi colaborator al lui Riegler; a adus contribuţii importante în probleme ca: infecţia experimentală cu bacilul morvei la taurine, tipizarea virusului febrei aftoase prin RFC, tratamentul durinei cu neosalvarsan etc.

LOCUL BACTERIILOR ÎN CADRUL LUMII MICROBIENE ŞI CARACTERISTICILE LOR

Bacteriile sînt microorganisme unicelulare, aparţinînd regnului vegetal, deosebite de celelalte două grupe importante de microorganisme (virusurile şi ciupercile microscopice) prin caracterele arătate în tabelul 1 (pag. 16—19).

ÎNSUŞIRILE MORFO-FIZIOLOGICE CARE SERVESC LA INDIVIDUALIZAREA BACTERIILOR CA ENTITĂŢI TAXONOMICE

Morfologie. Toate speciile bacteriene se găsesc în natură sub formă vegetativă. Unele specii au posibilitatea ca în anumite condiţii de mediu să sporuleze.

Caracterele diferențiale între bacterii,

Caracterul diferențial	Grupul de Virusuri
Tipul de organizare morfo-biologică	Subcelular
Conținutul în acizi nucleici	Un singur acid nucleic (ADN sau ARN)
Organizarea materialului nuclear	Acidul nucleic constituent al genomului viral este acoperit de capsidă
Particularități privind citoplasma	Nu au
Structura învelișului	Constituit din capsidă și la unele virusuri din capsidă și peplos. Structura învelișului este predominant proteică
Echipamentul enzimatic necesar proceselor vitale	Nu au echipament enzimatic propriu. Folosesc echipamentul enzimatic al celulei gazdă
Raporturile ecologice cu organismul gazdă	Parazitism intracelular obligatoriu și absolut

TABELUL 1

virusuri şi ciuperci microscopice

microorganisme	
Bacterii	Ciuperci microscopice
Celular	Celular
Ambii acizi nucleici (ADN şi ARN)	Ambii acizi nucleici (ADN şi ARN)
ADN dublu catenar, constituit dintr-o singură moleculă, se găseşte în citoplasmă, fără să fie delimitat de o membrană proprie (tip procariot)	Nucleu delimitat de membrană proprie, la fel ca la organismele superioare (tip eucariot)
Din citoplasmă lipsesc mitocondriile şi reticulul citoplasmatic	Citoplasma conţine mitocondrii şi reticul citoplasmatic
Constituit din membrană citoplasmatică şi perete celular, în care predomină o glucopeptidă. Unele bacterii secretă, în unele condiţii, un al 3-lea strat al învelişului (capsula)	Constituit din membrană şi perete celular, care conţine unii componenţi absenţi la bacterii (chitină, glucan, manan)
Au echipament enzimatic propriu	Au echipament enzimatic propriu
Un număr limitat de bacterii sînt parazite intracelulare obligatorii (rickettsiile). Restul bacteriilor pot fi parazite, epifite sau saprofite	Pot fi parazite, epifite sau saprofite

Caracterul diferenţial	Grupul de Virusuri
Modul de reproducere	Obligator în celula gazdă, pornind de la genomul viral ca model
Stări posibile de existenţă în natură	Virion-virus complet. Virus vegetativ-virus în forma de multiplicare intracelulară. Provirus-genom viral integrat în cromozomul celulei gazdă
Dimensiuni în microni	0,008—0,3
Volumul în microni^3	
Sensibilitatea la antibiotice	Insensibile

Celula vegetativă este constituită dintr-un înveliş şi un conţinut. Invelişul la rîndul lui este compus dintr-o membrană citoplasmatică, componentă obligatorie şi permanent prezentă la toate bacteriile, un perete celular prezent permanent la toate bacteriile cu excepţia micoplasmelor şi capsula, un înveliş suplimentar, facultativ, elaborat de

TABELUL 1 *(continuare)*

microorganisme	
Bacterii	Ciuperci microscopice
Independent, pornind de la ansamblul integrat al constituenților celulari, prin sciziparitate, rareori prin înmugurire; tot rareori diviziunile celulare sînt precedate de procese sexuate (conjugare)	Prin multiple forme: diviziune binară (creșterea vegetativă a miceliului), prin înmugurire (mai ales levurile) și prin spor. Sporul ca celulă specializată reproducătoare este deseori rezultanta unor procese sexuate
Celulă (formă) vegetativă — obligatorie. Spor — ca formă de conservare-numai la unele specii	Thal (miceliu)-spor ca celulă reproducătoare
0,4—15 lungime / 0,1—3 grosime	1—20 lungime / 1—5 grosime
1—5 microni^3	20—50 microni^3
Sensibile	Sensibile la alte antibiotice, decît cele la care sînt sensibile bacteriile

un număr limitat de bacterii și numai în anumite condiții de mediu. Conținutul este constituit din citoplasmă și material nuclear (aparat nuclear sau nucleoid). Citoplasma în stare de gel conține diferite granule (ribozomi, granule lipoidice de glicogen, de amidon, de acid poli-beta-hidroxibutiric, de polimetafosfat, de pigment și la

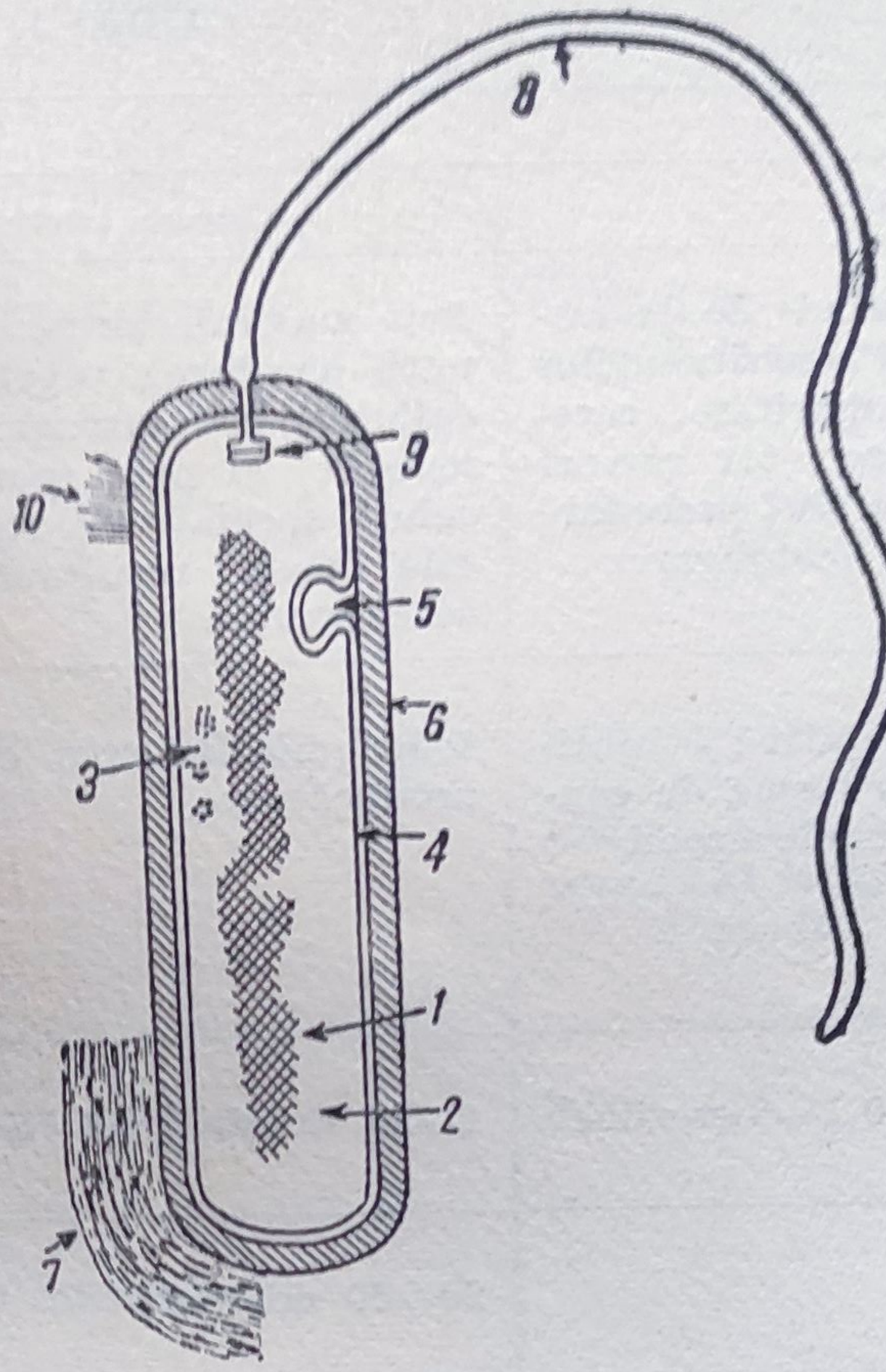


Fig. 1 — Anatomia celulei bacteriene (reprezentare schematică):

1 — material nuclear; *2* — citoplasmă; *3* — ribozomi; *4* — membrană citoplasmatică; *5* — mezozom; *6* — perete celular; *7* — capsulă; *8* — cil; *9* — granulă bazală; *10* — pili

bacteriile ciliate, granule bazale care servesc ca puncte de inserţie cililor). Materialul nuclear nu este delimitat de membrană şi este format dintr-o singură moleculă de ADN care constituie un singur cromozom. Unele specii bacteriene posedă organite pe suprafaţa celulei. Organitele sînt cilii sau flagelii şi pilii sau fimbriile.

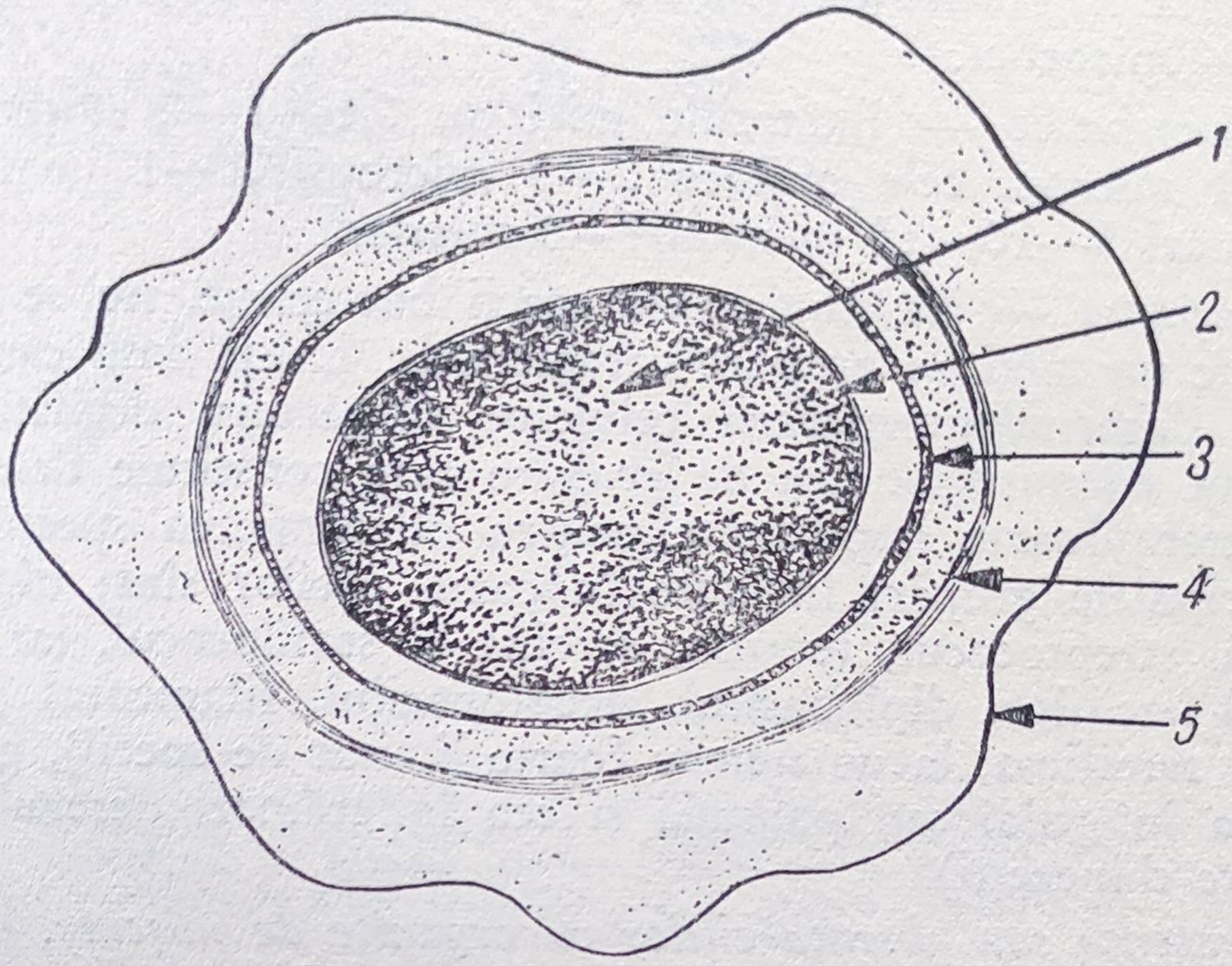


Fig. 2 — Anatomia sporului:
1 — sporoplasmă; *2* — membrană; *3* — cortex; *4* — tunici; *5* — exosporium

La speciile sporogene celula vegetativă se poate transforma în anumite condiţii în spor (sporogeneză), iar acesta la rîndul lui se poate transforma în celulă vegetativă (germinare). Sporul este o formă de conservare, incapabilă de multiplicare, format din material nuclear şi citoplasmă (sporoplasmă), un înveliş intern (cortexul), unul extern pluristratificat (tunicile). La unele specii sporul are un înveliş suplimentar facultativ — exosporium.

Criteriile morfologice utile în practica identificării bacteriilor sînt următoarele:

Forma — Bacteriile pot avea formă sferică sau ovală — coc; uşor alungită — cocoidă; alungită scurtă cu capetele rotunjite — coco-bacilară; alungită dreaptă, de bastonaş, cu capetele tăiate drept sau rotunjite — bacil; alungită,

incurbată în formă de virgulă — vibrion; alungită spiralată — spirochet.

Dimensiunile — Bacteriile mici au 0,1—1—2 microni/0,1—1 micron, cele mijlocii 2—3 microni/0,1—1 micron, cele mari 3—10—15 microni/1—3 microni.

Gruparea — La numeroase specii bacteriene, nu se întîlneşte un mod de grupare caracteristic. Există însă cazuri cînd, datorită neseparării celulelor consecutiv diviziunii, rezultă anumite moduri de grupare care constituie deseori caractere foarte importante pentru diferenţierea speciilor. Principalele grupări întîlnite în cazul cocilor sînt: diplococul, streptococul, tetrada, sarcina şi stafilococul, iar în cazul bacililor: diplobacilul, streptobacilul, filamentul (rareori ramificat, la un număr foarte limitat de specii), gruparea în grilaj sau palisadă şi cea în grămezi neregulate (litere chinezeşti).

Prezenţa sau absenţa cililor ca organite de mişcare. Din punct de vedere al numărului şi modului de dispunere

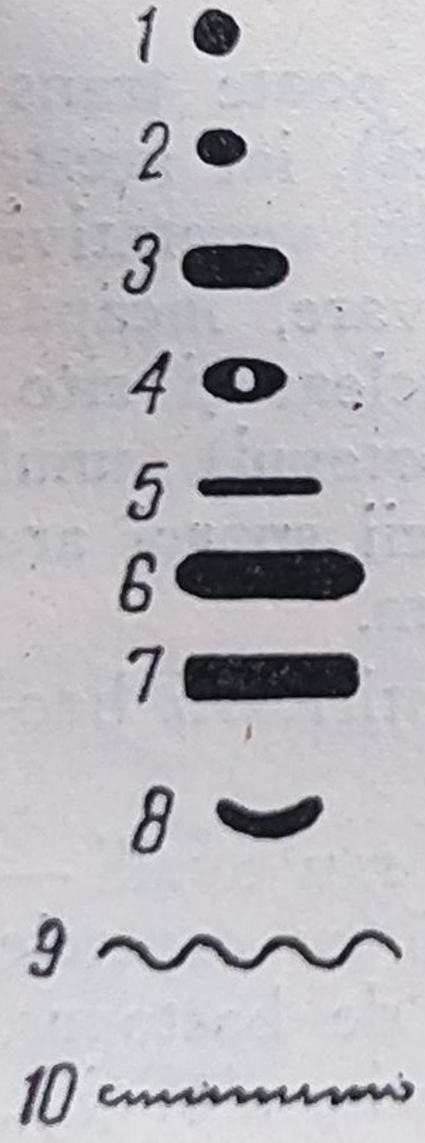


Fig. 3 — Forme posibile la bacterii:
1 — coc sferic; *2* — coc oval; *3* — cocobacil; *4* — cocobacil cu aspect bipolar; *5* — bacil fin; *6* — bacil gros cu capete rotunjite; *7* — bacil gros cu capete retezate; *8* — vibrion; *9* — spirochet cu spirale mari; *10* — spirochet cu spirale mici

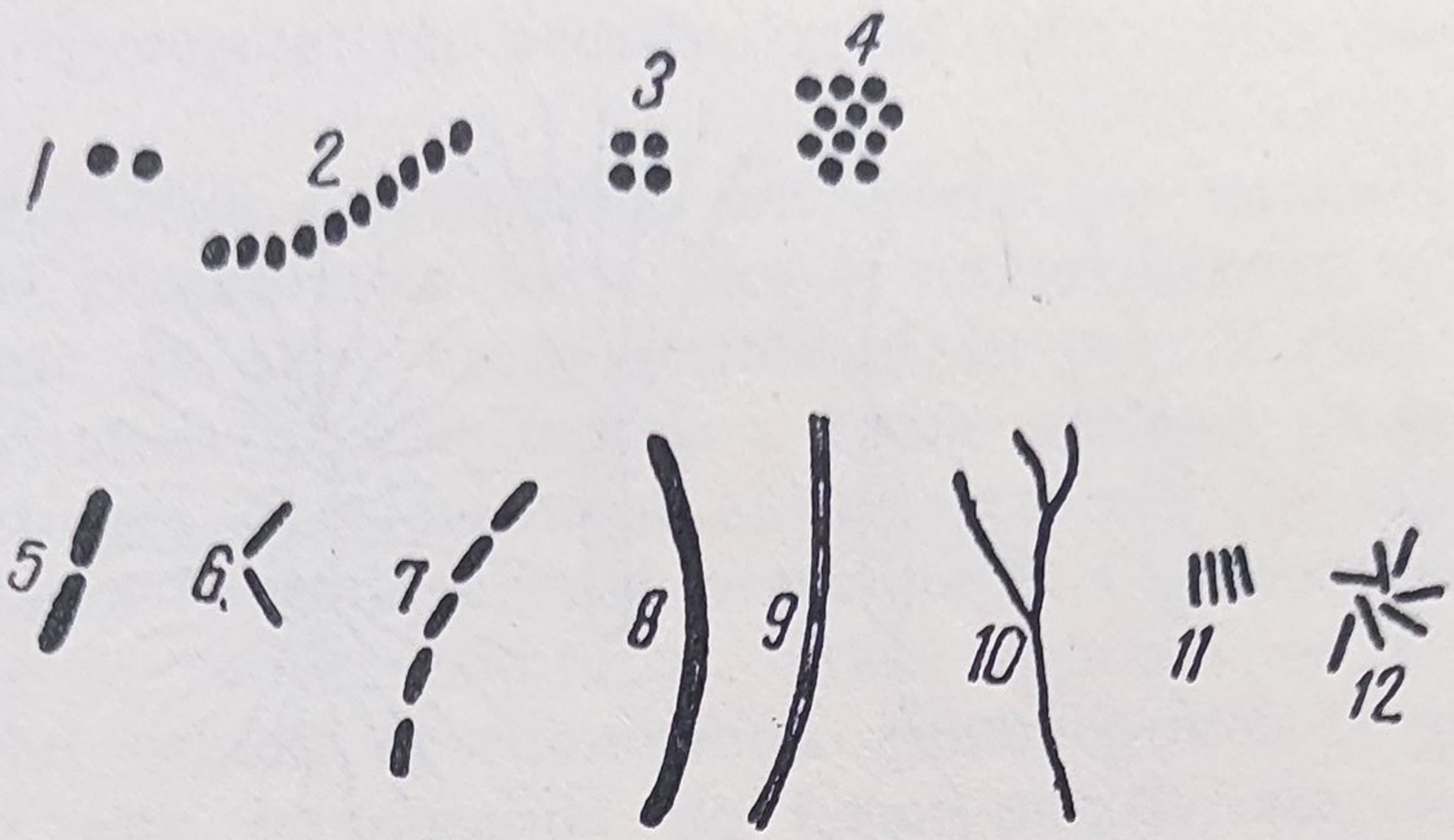


Fig. 4 — Modul de grupare la bacterii:
1 — diplococ; *2* — streptococ; *3* — tetrada-sarcina; *4* — stafilococ; *5* — diplobacil; *6* — grupare diplo în unghi; *7* — streptobacil; *8* — filament; *9* — filament cu citoplasma granulară; *10* — filament ramificat (foarte rar la bacterii); *11* — grupare în grilaj (palisadă); *12* — grupare neregulată de bacili (literă chinezească)

a cililor pe suprafaţa celulei bacteriene se deosebesc următoarele situaţii posibile: absenţa totală a cililor — atricha; un singur cil polar — monotricha; cîte un cil la ambii poli — amfitricha; un smoc de cili la unul din poli — lofotricha; numeroşi cili pe toată suprafaţa celulei bacteriene — peritricha.

Posibilitatea celulei de a capsula în anumite condiţii de mediu. Majoritatea speciilor capsulogene sînt capsulate în organism şi necapsulate în culturi pe medii obişnuite.

Prezenţa sau absenţa sporului şi caracteristicile acestuia. La speciile aerobe rata de sporulare este în concordanţă directă cu gradul de aerare al mediului, iar la cele anaerobe cu strictеţea condiţiilor de anaerobioză. Sporul are o formă rotundă sau ovală, poate fi situat central, subterminal, terminal sau lateral — excentric. În funcţie de raportul dintre diametrul transversal al sporului şi cel

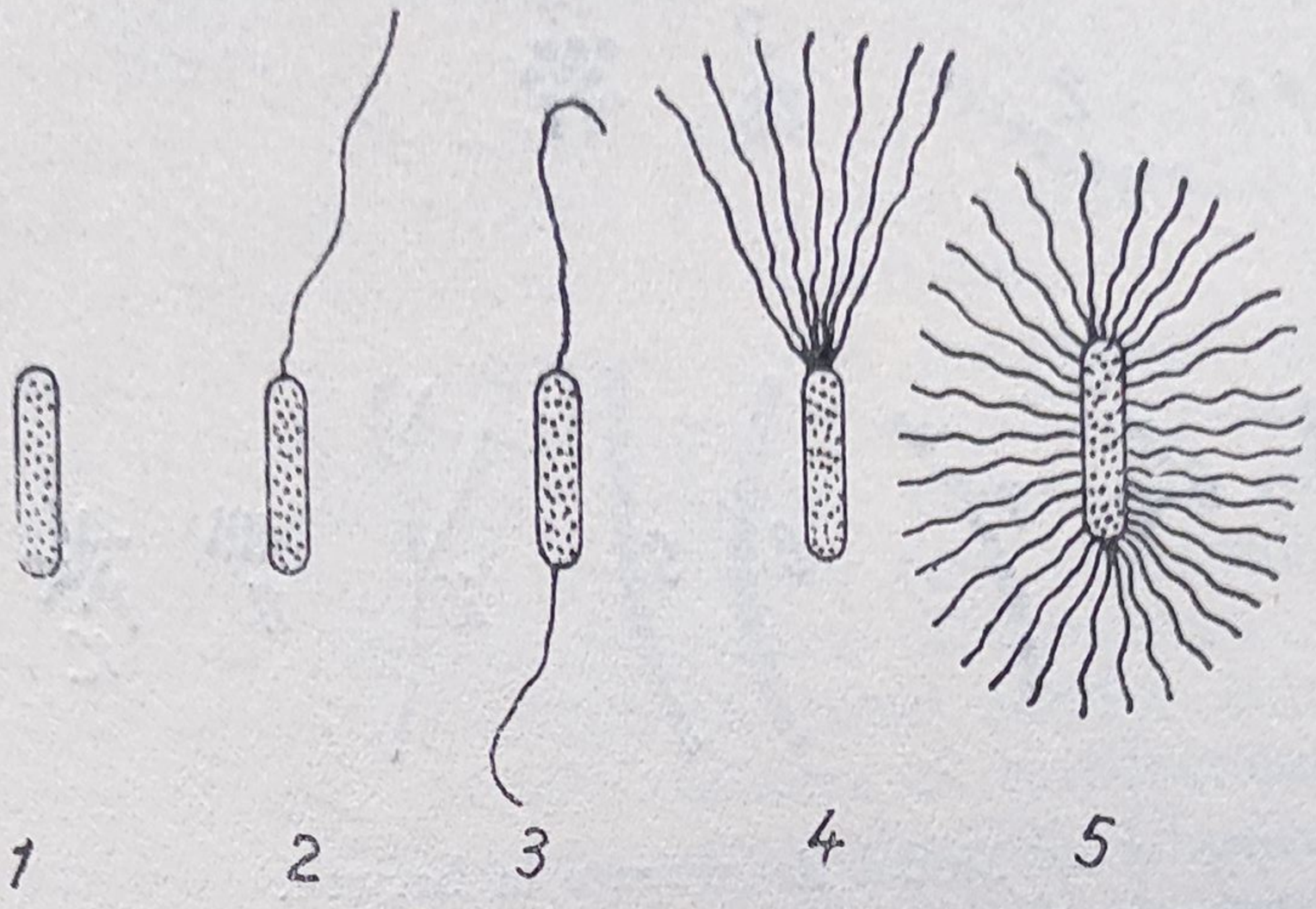


Fig. 5 — Numărul şi tipuri de dispunere a cililor pe suprafaţa celulei bacteriene:
1 — atricha; *2* — monotricha; *3* — amfitricha; *4* — lofotricha; *5* — peritricha

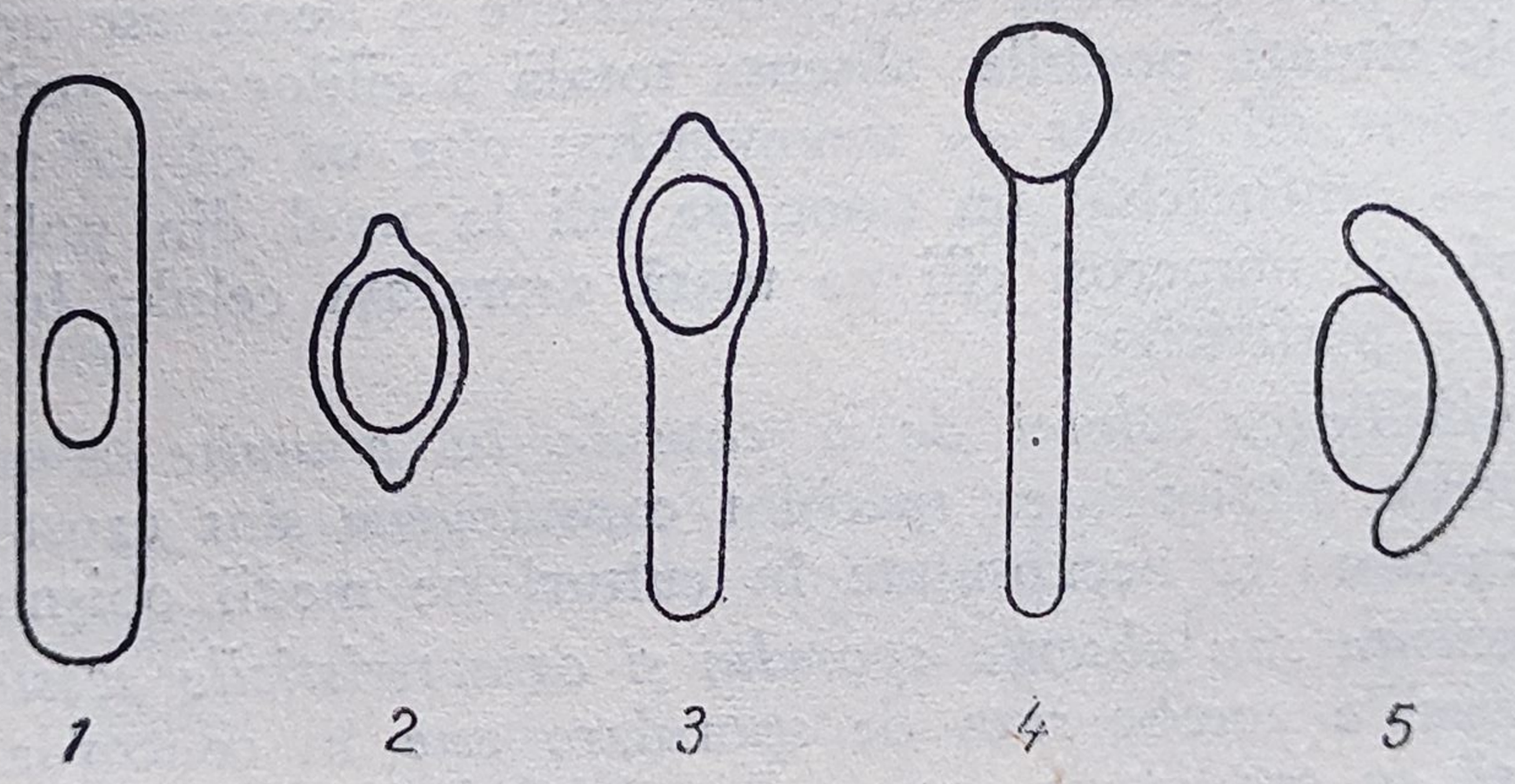


Fig. 6 — Diferite poziţii ale sporului în raport cu celula vegetativă:
1 — spor central cu diametrul transversal mai mic decît al celulei vegetative; *2—5* — spor cu diametrul transversal mai mare decît al celulei vegetative; *2* — central; *3* — subterminal; *4* — terminal; *5* — lateral (asimetric)

al celulei vegetative, aceasta poate suferi diferite deformări.

Proprietăţile (afinităţile) tinctoriale ale bacteriilor reprezintă posibilitatea de a fixa şi reţine diferite substanţe colorante. În acest sens, interesează în primul rînd Gram-pozitivitatea (capacitatea de a reţine violetul de genţiana sub acţiunea decolorantă a alcool-acetonei) sau Gram-negativitatea (absenţa acestei proprietăţi). Comportarea bacteriilor în cadrul coloraţiei Gram depinde de structura peretelui celular (predominenţa glucopeptidei în peretele celular este responsabilă de Gram-pozitivitate, în timp ce structura mai complexă în care intră şi componenţi lipidici, iar mucopeptida se găseşte situată mai profund şi în strat discontinuu, este determinantă pentru Gram-negativitate). O altă proprietate tinctorială care se ia în considerare la identificarea unor bacterii este acidorezistenţa (capacitatea de a reţine fucsina sub acţiunea decolorantă a acizilor), proprietate mai accentuată pentru genul *Mycobacterium* şi mai redusă pentru genul *Nocardia* şi ordinul *Rickettsiales*. Bacteriile lipsite de perete celular, cum este cazul micoplasmelor, sînt în general greu colorabile.

Variaţiile caracterelor morfologice în cadrul unei specii pot privi forma (polimorfism sau pleomorfism) sau pierderea unor particularităţi morfologice care constituie un atribut al normalului pentru specia respectivă (capsula, cilii, sporul).

Condiţiile de cultivare şi caracterele culturale. Marea majoritate a bacteriilor, cu excepţia rickettsiilor, care ca şi virusurile sînt parazite intracelulare obligatorii, sînt cultivabile pe medii inerte. Bacteriile se multiplică prin sciziparitate, rareori precedată de un proces sexuat (conjugarea).

În practica izolării și cultivării bacteriilor se iau în considerare următoarele proprietăți:

Tipul respirator care poate fi: aerob, anaerob (strict sau facultativ) și microaerofil.

Mediul de cultură adecvat pe care este posibilă cultivarea, condiționat de nevoile nutritive ale speciei.

Temperatura optimă (pentru majoritatea speciilor patogene este 37°C).

Timpul sau viteza de dezvoltare (pentru majoritatea speciilor 24 ore).

Aspectul cultural reprezentînd modificările macroscopice ale mediilor lichide și caracterele coloniilor de pe suprafața sau din profunzimea mediilor solide (vezi pag. 266).

Principala variație privind caracterele culturale pe medii solide este disocierea în forme S (smoth) cu suprafața netedă, lucioasă și margini regulate și R (rough) cu suprafața aspră și marginile neregulate. Fenomenul acesta este întîlnit la numeroase specii bacteriene și este deseori corelat cu variația unor însușiri esențiale ale bacteriilor (structura antigenică, patogenitatea etc.).

Proprietățile metabolice sau biochimice reprezintă expresia în cadrul practicii bacteriologice a echipamentului enzimatic, în general constant pentru o specie. Bacteriile patogene sînt toate chemotrofe și își realizează toate procesele vitale cu ajutorul unui echipament enzimatic propriu. Posibilitățile de folosire a anumitor surse plastice și energetice de carbon, modalitățile de metabolizare a acestora, după cum și anumite procese enzimatice legate de respirație, formează obiectul a numeroase reacții sau teste biochimice (vezi pag. 276), care asamblate în scheme minimale sau maximale de diagnostic constituie criterii prețioase de identificare.

Variaţiile privind caracterele biochimice se referă la pierderea sau dobîndirea anumitor enzime, ceea ce motivează crearea de variante sau chimiotipuri în cadrul unor specii bacteriene.

Structura antigenică. Bacteriile au o structură antigenică complexă. În cadrul unei specii se deosebesc antigeni somatici sau O (din corpul bacterian), antigeni flagelari sau H (din cili), antigeni capsulari, sporali etc. În general, structura antigenică este specifică pentru o specie bacteriană. Există însă şi înrudiri antigenice între specii bacteriene mai apropiate sau mai îndepărtate, după cum şi deosebiri antigenice în cadrul aceleiaşi specii. Astfel, în cadrul unor specii pot fi diferenţiate mai multe grupe, serotipuri şi chiar subserotipuri, subdiviziuni de o deosebită importanţă practică în taxonomie şi practica identificării unor specii (salmonele, streptococi, leptospire etc.). Pentru diferenţierea serologică a bacteriilor se alege reacţia adecuată de la caz la caz (pag. 315).

Sensibilitate faţă de anumiţi factori fizici, chimici sau biologici.

Temperatura. Celulele vegetative sînt distruse la 50—60°C; sporii la 120°C căldură umedă şi 180°C căldură uscată; temperaturile joase au în majoritatea cazurilor o acţiune conservantă.

Razele ultraviolete au efect bactericid.

Dezinfectantele şi antisepticele acţionează prin diverse mecanisme, în general bactericid.

Chimioterapicele şi antibioticele pot acţiona bacteriostatic sau bactericid. Antibiograma prezintă deseori interes în adoptarea conduitei terapeutice în infecţiile bacteriene.

Bacteriocinele sau colicinele au acţiune litică, dar nu şi-au găsit încă o sferă de aplicabilitate în practica bacteriologică curentă.

Bacteriofagii au efect litic, consecutiv multiplicării lor în celula bacteriană şi sînt folosiţi în identificarea unor

specii prin test fagic (*Brucella abortus, Bacillus anthracis*) sau a unor lizotipuri în cadrul unor specii tipabile fagic (stafilococii, salmonelele etc.).

Patogenitatea este un atribut esenţial pentru speciile care intră în sfera de preocupări a bacteriologiei veterinare. Problemele de interes practic pentru identificare sînt:

Gazda natural receptivă, stabilită pe baza speciei animale de la care se izolează tulpina a cărei identificare se impune.

Animalele de laborator, sensibile la infecţia experimentală şi caracterele acesteia, care servesc deseori la determinarea calitativă sau cantitativă a patogenităţii (prin DLM sau DL_{50}).

Evidenţierea mecanismelor patogenităţii. Toxinele se decelează de obicei prin inocularea filtratelor culturilor în medii lichide de diverse vechimi. În unele situaţii, interesează numai anumite fracţiuni toxice prin metode *in vitro* (hemolizinele, lecitinaza etc.) sau *in vivo* (enterotoxina stafilococică).

Proprietăţile imunogene sînt legate de structura antigenică. Ele se cercetează numai în situaţiile în care se pune problema selecţionării unor tulpini necesare preparării unor vaccinuri.

SISTEMATICA (TAXONOMIA) BACTERIANĂ

Primele încercări de clasificare a microorganismelor aparţin lui Müller (1786), care împarte bacteriile în două grupe: *Vibrio* şi *Monas* şi lui Ehrenberg (1838), al cărui sistem include un număr mai mare de entităţi taxonomice. Cohn (1872), încadrează primul bacteriile în regnul vegetal şi propune o clasificare în care principalul criteriu este forma.

Propunerile de sistematică bacteriană care au urmat și care au avut o pondere mai mare în practica bacteriologică au fost următoarele: Migula (1894, 1895 și 1900), Lehmann și Neumann (7 ediții, dintre care ultima în 1927), Chester (1901), Buchanan (1916, 1917, 1918) și Bergey (4 ediții — prima în 1923 — ultima în 1936). Bergey moare în 1937 și un colectiv editorial își asumă responsabilitatea continuării, completării și actualizării edițiilor următoare sub titlul „Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology". De la moartea lui Bergey au mai apărut încă 3 ediții, ultima fiind publicată în 1957. În prezent este în pregătire ediția a 8-a. Sistematica din manualul lui Bergey este astăzi aproape unanim acceptată. În țara noastră, Stamatin, 1957, propune o grupare a bacteriilor pe criterii morfologice (formă, proprietăți tinctorale, sporogeneză), care îndeplinește condițiile unui foarte bun ghid didactic, fără a avea pretențiile unei sistematici.

Determinatoare cuprinzînd propuneri originale de clasificare a bacteriilor, care alături de manualul lui Bergey se găsesc astăzi în circulație în unele țări sînt: clasificarea lui Krasilnikov (1961), a lui Prévot (1961) și a lui Topley și Wilson (1964). Folosirea lor este însă relativ limitată. Aliniindu-ne uzanței care întrunește astăzi majoritatea adeziunilor, vom folosi (cu mici excepții) ordinea și denumirea entităților taxonomice din ultima ediție a manualului lui Bergey (1957).

Din punct de vedere al nomenclaturii, în bacteriologie, spre deosebire de virusologie, este definitiv înrădăcinată nomenclatura binară latină cu toate că în vocabularul curent de laborator se mai folosesc uneori și nume comune (de ex.:colibacil, bacilul cărbunelui etc.) sau nume în care locul principal îl ocupă cel al autorului care a descoperit bacteria respectivă (ex.: bacilul lui Koch, bacilul lui Preisz-Nocard etc.).

O dificultate care apare uneori în practica bacteriologică este existența mai multor denumiri latine pentru aceeași specie bacteriană în funcție de inspirația diferiților autori de a da sau de a folosi una sau alta din aceste denumiri (de ex.: *Shigella equirulis* sau *Actinobacillus equuli; Clostridium perfringens* sau *Clostridium welchi* etc.). Uneori, numărul sinonimiilor pentru o specie nu se rezumă la 2 sau 3, fiind mult mai mare. Nu ne-am putut permite să menționăm pentru fiecare bacterie toate sinonimele din determinatoare, rezumîndu-ne numai la cele mai uzuale.

Redăm în tabelul 2 (pag. 31) încadrarea în sistematica din manualul lui Bergey 1957 a genurilor cuprinse în prezenta lucrare.

CLASA SCHIZOMYCETES

ORDINUL PSEUDOMONADALES

FAMILIA PSEUDOMONADACEAE

Genul Pseudomonas

Specia Ps. aeruginosa (Ps. pyocyanea)

Numele comun: bacilul piocianic (bacilul puroiului albastru).

Gazda receptivă și infecția naturală: produce, singur sau în asociație cu alte bacterii, la om și diverse specii animale, infecții, de cele mai multe ori locale, deseori purulente (puroiul are o nuanță albastră-verzuie datorită pigmentului elaborat de bacterie). Uneori, poate produce infecții septicemice cu caracter enzootic la păsări — pseudomonoza aviară (Stoenescu și col., 1955) și sporadic la purcei (Dorofeev, 1964, Secașiu, 1969).

Surse de izolare: puroiul din leziuni (abcese, plăgi infectate), cadavre în putrefacție, fecale, ape poluate etc.

TABELUL 2

Poziția în clasificarea din „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" a genurilor care formează obiectul capitolelor următoare

Clasa	Ordinul	Familia	Genul
Schizomycetes	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas* *Aeromonas*
		Spirillaceae	*Vibrio*
	Eubacteriales	*Enterobacteriaceae*	*Escherichia* *Aerobacter* *Klebsiella* *Paracolobactrum* *Erwinia* *Serratia* *Proteus* *Salmonella*
		Brucellaceae	*Pasteurella* *Bordetella* *Brucella* *Haemophilus* *Actinobacillus* *Moraxella* *Sphaerophorus*
		Micrococcaceae	*Staphylococcus* *Gaffkya* *Sarcina*
		Lactobacillaceae	*Diplococcus* *Streptococcus* *Lactobacillus*
		Corynebacteriaceae	*Corynebacterium* *Listeria* *Erysipelothrix*
		Bacillaceae	*Bacillus* *Clostridium*
	Actinomycetales	*Mycobacteriaceae*	*Mycobacterium*

Clasa	Ordinul	Familia	Genul
	Actinomycetales	*Actinomycetaceae*	*Actinomyces* *Nocardia*
	Spirochaetales	*Treponemataceae*	*Borrelia* *Leptospira*
	Mycoplasmatales	*Mycoplasmataceae*	*Mycoplasma*
Microtatobiotes	*Rickettsiales*	*Rickettsiaceae*	*Rickettsia*
		Chlamydiaceae	*Miyagawanella*

Examen microscopic direct: neconcludent.

Condiţii de cultivare: bulion, agar, condiţii aerobe sau anaerobe, 24 ore la 37°C.

Identificare

Morfologie: cocobacil, 1,5 microni lungime şi 0,5—0,6 microni diametrul transversal. Necapsulat, slab mobil (1—3 cili), nesporulat, Gram negativ.

Caractere culturale: bulion — turbiditate intensă, depozit abundent uşor omogenizabil, peliculă la suprafaţă, uneori pigment spre suprafaţa mediului; agar — colonii rotunde, neuniforme, semitransparente, pigmentate.

Pigmentul: majoritatea tulpinilor elaborează un pigment verde-albăstrui (piocianina), din grupa fenazinelor, ceea ce reprezintă o caracteristică a speciei; pigmentogeneza este favorizată de prezenţa O_2; în cazul absenţei O_2 pigmentul este elaborat sub formă de leucoderivat incolor. Piocianina este solubilă în cloroform care se colorează în albastru. În

urma acidifierii se colorează în roşu datorită formării hemi-piocianinei, insolubilă în cloroform. Fluoresceina (pigment verde-gălbui) elaborată de alte numeroase specii din genul *Pseudomonas* se deosebeşte de piocianină prin insolubilitatea ei în cloroform.

Proprietăţi biochimice: nu produce indol şi nici H_2S. Proprietăţile zaharolitice sînt foarte reduse. Din 357 tulpini examinate de Cristea (1971), 26,52% au fermentat net glucoza şi alte 28,96% au produs numai o slabă acidifiere. Lactoza a fost fermentată în proporţie de sub 1% din totalul tulpinilor. După Bergey (1957), fructoza, galactoza, arabinoza, maltoza, zaharoza, dextrina, inulina, glicerolul, manitolul şi dulcitolul nu sînt fermentate. Produce hemoliză, reduce nitraţii, lichefiază gelatina, reduce albastrul de metilen şi roşul neutru, hidrolizează ureea şi produce catalază.

Proprietăţi antigenice: prin reacţiile de aglutinare şi seroprecipitare pot fi diferenţiate 9 grupe serologice. La animale, predomină serotipurile 4 şi 5. Cristea (1971) stabileşte prezenţa la păsări a serotipului 8, absent la celelalte specii animale. După acelaşi autor, tulpinile izolate din sacul prepuţial al taurilor aparţin serotipului 7.

Lizotipie: Meitert (1965) propune o schemă de lizotipie pentru tulpinile de origine umană, stabilind existenţa a 10 grupe fagice care includ 83 lizotipuri. Cristea (1971) găseşte această schemă adecvată tulpinilor de origine animală şi o completează cu alte 26 lizotipuri confirmate de Meitert ca lizotipuri noi.

Sensibilitatea la antibiotice şi chimioterapice: cele mai active sulfamide sînt marfanilul, sulfanilamida şi sulfatiazolul, iar sulfametazina, talazolul şi sulfaguanidina sînt inactive (Cristea, 1971). Dintre antibiotice sînt active polimixina B, streptomicina, megamicinul şi tetraciclina. Penicilina este inactivă.

TABELUL 3

Caracterele diferenţiale între principalele specii de Pseudomonas (după L i n s e r t şi col. 1970)

Testul diferenţial	Specia: *Ps. aeruginosa*	*Ps. fluorescens*	*Ps. syncyanea*	*Ps. denitrificans*
Temperatura optimă de dezvoltare	37°C (0—42°C)	20—25°C	25°C	25°C
Hemoliza	+	(+)		
Sinteza piocianinei	(+)	—	—	—
Sinteza fluoresceinei	+	+	+	+
Gelatinoliza	+	V	V	—
Comportarea faţă de laptele turnesolat	AP	Alc	ACP	—
Indol	—	—	—	—
H_2S	—	—	—	—
Reducerea nitraţilor	+	+	—	+
Glucoză	+	+		+
Fructoză	(+)	—		
Galactoză	(+)	—		
Arabinoză	(+)	—		
Trehaloză	(+)	—		
Manoză	(+)	—		
Xiloză	(+)	—		
Patogenitate pentru animale de laborator	pentru mai multe specii	—	—	—
Structură antigenică	mai multe tipuri	sînt antigenic distincte de *Ps. aeruginosa*		

Legendă: + = pozitiv, — = negativ, (+) = de regulă pozitiv, V = variabil, Alc = alcalinizare, A = acidifiere, C = coagulare, P = peptonizare

Patogenitate: animalele de laborator sensibile sînt cobaiul, şoarecele, şobolanul, iepurele. În urma inoculării intraperitoneale cu doze de 0,2—0,5 ml cultură în bulion, apar peritonite acute după 1—2 zile de la inoculare. Infecţia experimentală are pondere redusă pentru diagnostic.

Diferenţierea de alte specii din genul Pseudomonas. Din cele 149 specii cuprinse în determinatorul lui Bergey (1957), speciile faţă de care se impune mai frecvent diagnosticul diferenţial sînt: *Ps. fluorescens, Ps. syncyanea, Ps. denitrificans* (tabelul 3).

Genul Aeromonas

Specia A. punctata (Pseudomonas punctata)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: peşti, batracieni şi alte animale cu sînge rece. Produce hidropizia roşie a crapilor, boală cu caracter enzootic, care apare uneori în crescătorii. Asupra altor factori microbieni sau de mediu care ar interveni în declanşarea acestei boli există discuţii.

Surse de izolare: sîngele şi organele peştilor bolnavi de hidropizie; alţi peşti, broaşte etc. la care pare să se găsească pe suprafaţa mucoaselor ca epifit (Scurtu, 1957), apă.

Examen microscopic direct: neconcludent.

Condiţii de cultivare: bulion, agar, condiţii aerobe sau anaerobe, 24 ore la 37°C.

Identificare

Morfologie: cocobacil, polimorf, 1—1,5 microni lungime şi 0,7 microni diametru transversal. Necapsulat, mobil (un singur cil dispus polar), nesporulat, Gram negativ.

Caractere culturale: bulion — turbiditate intensă, uniformă, necaracteristică; agar — colonii rotunde, mari, neuniforme, opace, cu suprafaţa netedă şi lucioasă, margini regulate, nepigmentate.

Din punct de vedere morfologic şi cultural există o evidentă asemănare cu *Escherichia coli.*

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, zaharoza, galactoza, maltoza, manoza şi manitolul; nu fermentează lactoza; majoritatea tulpinilor produc indol şi H_2S, sînt hemolitice şi gelatinolitice.

Patogenitate: experimental este patogen pentru şoarece pe cale intraperitoneală şi pentru peşti prin inoculare în cavitatea generală, nu şi pe cale orală sau cutanată (culturile adăugate în apa acvariului nu reproduc infecţia).

Diferenţierea de alte specii din genul Aeromonas: În manualul lui Bergey sînt menţionate încă 3 specii de *Aeromonas* (*A. liquefaciens, A. hydrophila* şi *A. salmonicida*), faţă de care principalul criteriu de diagnostic diferenţial îl constituie patogenitatea pentru crap.

FAMILIA SPIRILLACEAE

Genul Vibrio

Specia V. fetus (Campylobacter fetus)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: taurine şi ovine. Produce vibrioza (avort cu *Vibrio*).

Surse de izolare: diferite organe ale avortonilor (stomacul glandular, pulmon, ficat), învelitori fetale, mucus cervical; de la masculi, sperma şi lichid prepuţial.

Examen microscopic direct: în conţinutul stomacului glandular, în lichidele fetale se observă între lamă şi lamelă germeni foarte mobili. În cazul masculilor, se reco-

mandă examenul depozitelor obţinute din centrifugarea serului fiziologic cu care se fiac spălături prepuţiale.

Condiţii de cultivare: medii speciale — agar cu sînge, bulion cu ser, bulion cu ficat Tarozzi cu ser, medii selective capabile să inhibe altă floră bacteriană prezentă în vagin sau prepuţiu (ex.: vezi pag. 249). Pentru izolare, incubarea trebuie făcută la 37°C timp de mai multe zile (3—7 zile) în condiţii anaerobe. O atmosferă îmbogăţită în CO_2 (10—20%) influenţează favorabil adaptarea bacteriei pe medii de cultură. După mai multe treceri, tulpinile se dezvoltă într-un timp mai scurt şi devin mai tolerante faţă de oxigen. Viabilitatea în culturi a tulpinilor recent izolate este relativ scurtă, fiind necesară transplantarea săptămînală. Tulpinile de laborator rezistă un timp mai îndelungat.

Identificare

Morfologie: bacterii uşor incurbate sau în formă de „S", dimensiunile sînt de 1,5—5 microni/0,2—0,5 microni. La tulpinile vechi, de colecţie, apar forme lungi spiralate. Deseori, citoplasma prezintă un aspect granular. Germenul este necapsulat, mobilitatea este accentuată şi se datoreşte unui singur cil dispus polar (monotricha), nesporulat, Gram-negativ.

Caractere culturale: în medii lichide aspectul este necaracteristic. Pe suprafaţa mediilor solide se dezvoltă colonii cu diametrul de 1—2 mm, cu suprafaţa netedă şi lucioasă, semiopace, cu o uşoară nuanţă albăstrie.

Proprietăţi biochimice: nu produce indol; nu fermentează glucoza, levuloza, lactoza, galactoza, zaharoza, maltoza, trehaloza, rafinoza, dextrina, inulina, salicina, manitolul, dulcitolul şi sorbitolul; nu lichefiază gelatina; datele de literatură privind comportarea faţă de laptele turnesolat sînt contradictorii; nu produce hemoliză, nu hi-

drolizează ureea; reduce nitraţii în nitriţi. Există diferenţe între tulpini privind producţia de H_2S şi de catalază, după cum şi din punct de vedere al comportării faţă de alte teste (dezvoltarea în mediul cu Bacto-thiol, toleranţa faţă de glicină, toleranţa faţă de bilă etc.). Pe baza acestor diferenţe, unii autori deosebesc mai multe grupe sau tipuri. Astfel Kayser (1959) consideră existenţa a 3 grupe, iar Fletcher şi Plastridge (citaţi de Merchant şi Packer, 1967) a 4 grupe biochimice distincte.

Structura antigenică: ca la celelalte bacterii ciliate, *Vibrio fetus* posedă antigeni O şi H. Pe baza aglutinărilor încrucişate pot fi deosebite mai multe tipuri. Astfel, *Price* şi col., 1955, deosebesc 4 serotipuri bovine şi unul ovin. Se pare că există înrudiri antigenice între *Vibrio fetus* şi *Brucella abortus*, atestate de posibilitatea reacţiilor încrucişate între antigeni *Vibrio fetus* şi seruri *Brucella abortus*.

Metodele de diagnostic serologic al vibriozei, cele mai adecvate, sînt reacţiile de aglutinare a unei suspensii de *Vibrio* fie cu ser, fie cu mucus cervico-vaginal. Mucusul vaginal se recoltează cu ajutorul unui tampon care se menţine în fundul vaginului timp de 30 minute. Apoi se scoate se cîntăreşte, se adaugă ser fiziologic formolat 0,1%, în proporţie de 12,5 ori greutatea tamponului. Se lasă 24 ore, apoi se stoarce tamponul, se centrifughează lichidul, iar supernatantul este utilizat pentru aglutinare.

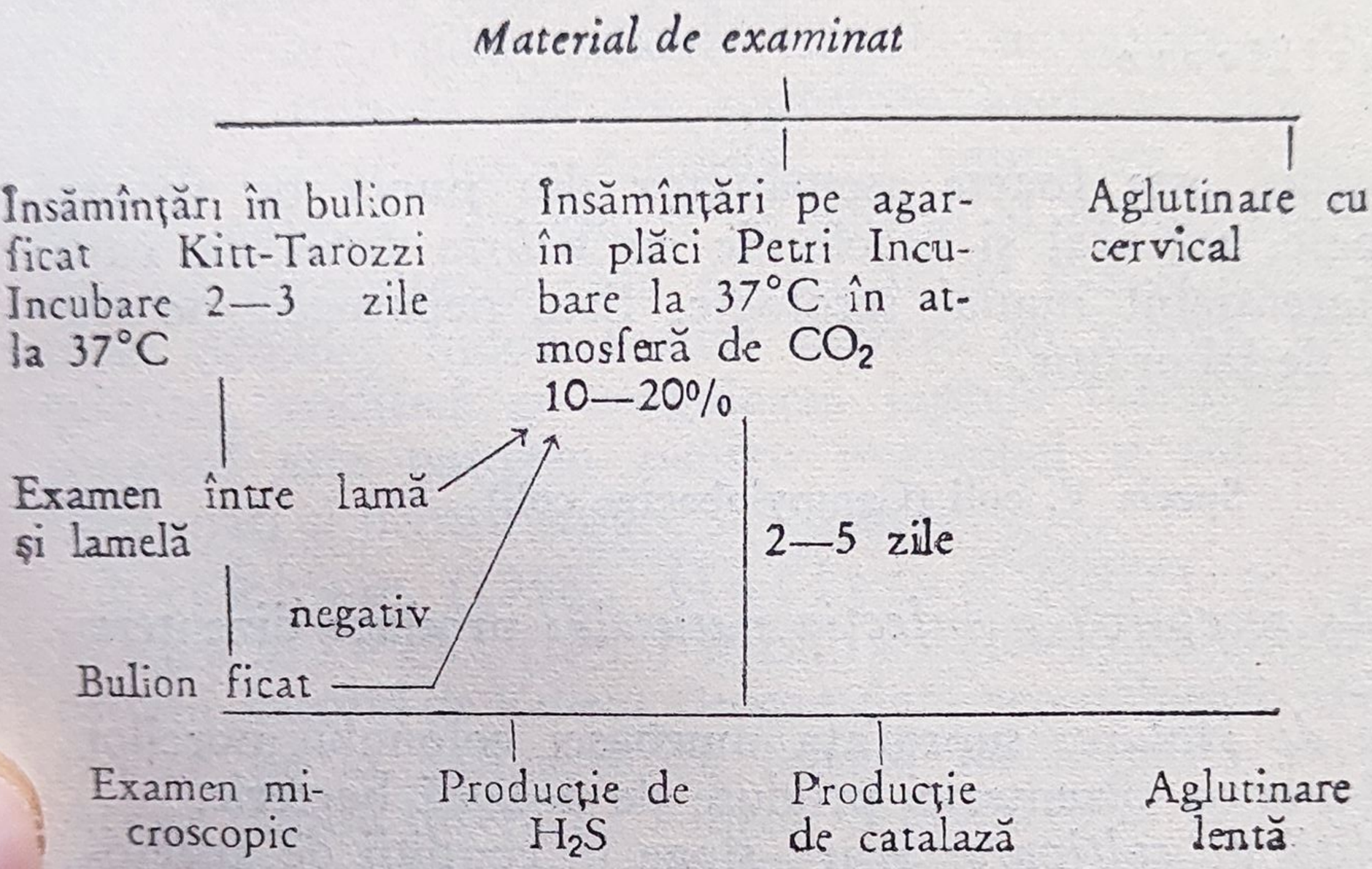
Rezultate bune se obţin şi prin reacţia de hemaglutinare indirectă cu hematii de oaie sensibilizate în prealabil prin contact cu extracte de *Vibrio fetus*.

Rezistenţa: factorii fizici şi chimici acţionează la fel ca în cazul tuturor bacteriilor nesporulate. Dintre antibiotice, cel mai activ este streptomicina.

Patogenitatea: factorii patogenităţii nu sînt studiaţi în suficientă măsură. Dintre animalele de laborator, cele mai sensibile sînt femelele gestante de cobai şi hamster la

care principala manifestare a infecţiei experimentale este avortul însoţit de leziuni edematoase congestive şi hemoragice. Infecţia experimentală este de asemenea posibilă pe embrioni de găină.

Diagnostic: L i n s e r t şi col. (1970) propun următoarea schemă de diagnostic etiologic al vibriozei:



Vibrio bubulus este considerat de unii autori ca o specie aparte, de alţii ca o variantă a speciei *Vibrio fetus*. În determinatorul B e r g e y, 1957, nu este omologat ca specie. Principalele caractere care diferenţiază *Vibrio bubulus* de majoritatea tulpinilor aparţinînd tipului clasic de *Vibrio fetus* sînt: producţia de catalază negativă, producţia de H_2S pozitivă, toleranţa la bilă negativă, toleranţa la glicină pozitivă şi structura antigenică distinctă. Majoritatea autorilor consideră *Vibrio bubulus* nepatogen.

Specia V. jejuni (Campylobacter jejuni)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: produce enterite la taurine (mai ales la tineret).

Surse de izolare: conţinut intestinal şi lichid de spălare a mucoasei intestinale.

Condiţii de cultivare: însămînţări pe agar—sînge sau agar la care se adaugă ţesut renal proaspăt. Condiţiile optime de cultivare sînt cele microaerofile la temperatura de 37,5°C.

Identificare

Germenul este foarte asemănător din punct de vedere morfologic, cultural şi biochimic cu *Vibrio fetus*, de care este diferenţiabil numai serologic. Este nepatogen pentru animale de laborator.

Specia V. coli (Campylobacter coli)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: produce dizenteria la porc.

Surse de izolare: suprafaţa mucoasei colonului porcilor morţi în urma dizenteriei produse de această bacterie.

Condiţii de cultivare: agar—sînge în condiţii de anaerobioză în atmosferă de CO_2 15%.

Identificare

Morfologic şi cultural este asemănător cu *Vibrio fetus*. Reacţionează negativ la majoritatea testelor biochimice. Unele tulpini produc catalază şi reduc nitraţii în nitriţi.

Specia V. metschnikovii

Gazda receptivă şi infecţia naturală: poate fi patoge pentru păsări, la care produce o gastroenterită.

Surse de izolare: organele păsărilor infectate.

Condiţii de cultivare: aerob, creşte pe medii uzuale (bulion, agar), la temperatura camerei.

Identificare

Din punct de vedere morfologic este asemănător cu celelalte specii de *Vibrio*. Aspectul cultural se caracterizează prin formarea unei pelicule fine la suprafaţa bulionului, pe care-l tulbură, iar pe suprafaţa agarului prin formarea de colonii mici rotunde, cu suprafaţa lucioasă, de culoare gălbuie. Din punct de vedere al proprietăţilor biochimice fermentează fără producţie de gaz glucoza şi lactoza; produce indol, reduce nitraţii în nitriţi, lichefiază gelatina, acidifică şi coagulează laptele turnesolat. Experimental este patogen pentru porumbel şi cobai, iar în doze mari şi pentru iepure şi şoarece.

Peckham (1958), Hoffstad (1958) în S.U.A., Moga Mînzat (1969) şi Elias (1971) în ţara noastră, descriu tulpini de *Vibrio*, deocamdată neomologate ca specie, izolate de la galinacee cu leziuni de hepatită necrotică. Aceste tulpini diferă de *Vibrio metschnikovii* prin aceea că sînt microaerofile, nu cresc pe medii obişnuite, fiind serofile, nu produc indol, sînt nezaharolitice şi nepatogene pentru porumbel şi nici pentru cobai. Se izolează în bune condiţii pe embrioni de găină.

Specia V. piscium

Se izolează de la peşti, la care produce o infecţie cu un grad de contagiozitate ridicat. Morfologic nu se deosebeşte de celelalte specii. Este aerob, anaerob facultativ. Temperatura optimă de cultivare este de 18—20°C. Tulbură bulionul, cu constituirea unei pelicule la suprafaţă. Formează pe agar colonii de tip S, rotunde, avînd o culoare gălbuie, semitransparente. Produce indol şi H_2S. Este

lipsit de proprietăţi zaharolitice, coagulează laptele, reduce nitraţii în nitriţi. Este patogen experimental pentru broaşte.

Specia V. comma (V. cholerae)

Este patogen pentru om, la care produce holera, boală originară din Asia, cu putere foarte mare de difuziune, transmisibilă prin contact direct, prin apă şi alimente, poluate cu fecalele bolnavilor. Muştele pot fi vectori. A produs epidemii şi pandemii în trecut. Astăzi este cantonată sub formă de focare endemice în Asia. Este nepatogen pentru animale.

ORDINUL EUBACTERIALES

FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

Genul Escherichia

Specia E. coli

Numele comun: colibacil.

Gazda receptivă, infecţia naturală: colibaciloza la om şi animale are diferite manifestări clinice: la om — infecţii intestinale, uro-genitale, peritonite, meningite; la tineretul bovin, porcin şi cabalin — gastroenterite, septicemii; la bovinele şi la ovinele adulte — mamite, avort; la porcinele adulte — gastroenterite, boala edemelor (edemul gastrointestinal); la tineretul aviar — colibaciloza; la păsările adulte — granulomatoza colibacilară. Formele cele mai grave cu evoluţie enzootică se întîlnesc la tineretul speciilor amintite.

Surse de izolare. Animale: diferite organe (ganglionii mezenterici), secreţii, exsudate (lichid peritoneal, pleural),

conținut intestinal, abcese, os lung. Alte materiale: alimente (lapte etc.), apă. Servește ca indice igienico-sanitar pentru aprecierea gradului de poluare a apei, laptelui și altor produse lactate.

Examen microscopic direct: bacil, cocobacil Gram negativ fără grupări caracteristice, uneori colorat bipolar. Examenul microscopic direct nu este concludent.

Condiții de cultivare: este aerob, anaerob facultativ; temperatura de 37,5°C și pH 7 sînt optimale. Mediile cele mai adecvate pentru izolare sînt bulionul, agarul, după cum și întreg arsenalul de medii speciale pentru enterobacteriacee (pag. 243—248).

Identificare

Morfologie: bacil, 1—4 microni lungime, 0,2—0,5 microni grosime, polimorfism accentuat; nesporulat, necapsulat, mobil (cili dispuși peritrih), Gram negativ, frecvent bipolar.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate intensă, uneori inel la suprafață, în culturi vechi depozit abundent ușor omogenizabil. Agar — colonii de dimensiuni variabile (2—6 mm diametru), opace, nepigmentate, suprafața netedă, margini regulate. Pe medii diferențiale aspectele sînt diferite în funcție de mediul folosit (vezi tabelul nr. 4). Culturile degajă miros de amoniac.

Proprietăți biochimice: fermentează glucoza, galactoza, lactoza, maltoza, arabinoza, xiloza, ramnoza și manitolul, inconstant zaharoza, rafinoza, salicina, esculina, dulcitolul și glicerina.

Nu lichefiază gelatina, produce indol, nu produce H_2S, roșu metil pozitiv, Voges Proskauer negativ, nu utilizează citrații ca sursă de carbon, reduce nitrații în nitriți, nu hidrolizează ureea, acidifică și coagulează laptele. Unele

TABELUL 4

Aspectul coloniilor de E. coli pe unele medii de diagnostic diferenţial

Mediul	Culoarea mediului la preparare	Culoarea coloniilor de E. coli
Drigalski	Violet	Roşu
Endo	Necolorat	Roşu
Gassner	Verde	Albastru
E.M.B.	Violet	Negricioase cu luciu etalic

tulpini sînt hemolitice faţă de globulele roşii de cal şi cîine.

Din punct de vedere al comportării faţă de zaharoză se pot deosebi în cadrul speciei *E. coli*, două variante: *E. coli communis*-zaharoză — şi *E. coli communior* — zaharoză +.

Proprietăţile antigenice: E. coli posedă mai mulţi antigeni:

— antigeni somatici sau antigeni O — sînt antigeni de grup, pe baza cărora specia este împărţită în grupe serologice. Se cunosc pînă în prezent 150 antigeni O;

— antigeni flagelari sau antigeni H — aproximativ 50;

— antigeni de suprafaţă sau antigeni K — sînt reprezentaţi prin mai multe fracţii antigenice deosebite, care nu coexistă la aceeaşi tulpină, se comportă diferit faţă de factori fizici şi chimici şi sînt notate cu literele: L — antigeni de înveliş (aproximativ 30); B — antigeni de înveliş (peste 20); A — antigeni capsulari (la formele capsulate de *E. coli*).

În cadrul speciei *E. coli* se deosebesc, pe baza structurii antigenice, mai multe grupe și subgrupe serologice notate cu litere sau cifre.

Tulpinile de *E. coli* patogene, care se izolează din gastroenterite de la om, posedă antigen B și sînt notate prin numărul antigenului de grup urmat de numărul antigenului de înveliș (de exemplu: $O_{111}B_5$; $O_{55}B_5$; $O_{28}B_6$ etc.).

Identificarea serologică a tulpinilor de *E. coli* de origine animală se oprește deseori la antigenul de grup. În țara noastră, între tulpinile izolate din infecții cu *E. coli* de la animale, au fost semnalate următoarele serotipuri: la vaci cu mamită, O_{39}, O_{88}; la viței, O_{15}, O_{21}, O_{17}, O_5; la porci, O_8, O_{11}, O_{41}, O_{84}, O_9; O_{117}; la păsări, O_1, O_2, O_3, O_5, O_8, O_{73}, O_{78}.

Tipizarea serologică a colibacililor se face prin reacția de aglutinare pe lamă, în tub sau prin imunofluorescență cu ser polivalent pentru identificarea speciei și cu seruri monovalente pentru identificarea serotipurilor.

Pentru determinarea antigenilor somatici „O" se folosesc culturi încălzite două ore și jumătate la 100°C, pentru antigenii „H" culturi în bulion formolate, iar pentru antigenii de suprafață „K" se folosesc culturi vii.

Rezistența: rezistă luni de zile în mediul extern (sol, apă etc.), timp de o oră la 55°C, 15—20 minute la 60°C. Sensibil la dezinfectante uzuale (fenol, sublimat, cloramină) și coloranți din grupul trifenilmetanului (verde briliant, verde malahit).

Față de antibiotice se comportă diferit; este rezistent față de penicilină datorită elaborării de penicilinază și în general sensibil față de antibiotice extrase din diferite specii de *Streptomyces* (streptomicină, cloramfenicol, aureomicină).

În laborator se conservă bine în agar moale sub oleu de parafină la +4°C (2—3 ani).

Patogenitatea se datorește toxicității și mai puțin virulenței. S-au pus în evidență: o exotoxină termolabilă, cu

acţiune neurotoxică pentru animale de laborator; o endotoxină de natură proteică relativ termolabilă care provoacă enterită hemoragică şi leziuni viscerale şi o endotoxină de natură glucido-lipidică insolubilă, termostabilă, care inoculată intravenos la cobai şi şoarece provoacă enterită acută.

De interes practic este decelarea fracţiunii enterotoxice, determinată genetic de o plasmidă transferabilă. Enterotoxina poate fi pusă în evidenţă prin testul ansei ligaturate de iepure (De şi Chatterje, 1953).

Culturile integrale de *E. coli*, inoculate intravenos sau intraperitoneal la iepure, şoarece, pot produce moartea animalelor.

Stabilirea responsabilităţii *E. coli* într-un proces patologic din care se izolează, cu excepţia colibacilozelor care evoluează enzootic la tineret, este deseori dificilă, datorită răspîndirii ubicvitare a bacteriei şi a caracterului neconcludent şi neconcordant al testelor de care practica bacteriologică dispune pînă astăzi pentru aprecierea patogenităţii tulpinilor. Ţinînd seama de gradul lor de relativitate, testele de patogenitate mai frecvent utilizate sînt: serotipia, examenul activităţii hemolitice faţă de hematiile de cal, evidenţierea enterotoxinei, colicinogenia şi colicinosensibilitatea (tulpinile izolate din procese patologice sînt mai frecvent colicinogene, în timp ce tulpinile provenind din medii naturale sînt mai frecvent colicinosensibile) şi testul de aglutinare a spermatozoizilor de cîine.

Specia E. freundii (Citrobacter freundii)

Gazda receptivă, infecţia naturală: bacteria se găseşte în mod normal în intestinul omului şi animalelor. În anumite condiţii poate deveni patogenă şi determină infecţii intestinale.

Sursa de izolare: sol, apă, conţinut intestinal om, animale.

Condiţii de cultivare: aerob, anaerob facultativ; temperatură optimă de dezvoltare 30—37°C.

Identificare

Morfologie: bacili scurţi, extremităţi rotunjite, izolaţi, perechi sau lanţuri scurte, nesporulaţi, necapsulaţi, mobili, Gram negativi.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură mediul uniform; medii solide — colonii netede, lucioase, cenuşii.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, fructoza, galactoza, arabinoza, xiloza, rafinoza, lactoza, maltoza, manoza, ramnoza, trehaloza, glicerolul, manitolul şi sorbitolul, inconstant salicina, dulcitolul, adonitolul şi inozitolul; în general, nu produce indol, produce H_2S, utilizează citraţii ca unică sursă de carbon, reduce nitraţii, nu descompune ureea; reacţia roşului de metil este pozitivă, reacţia Voges Proskauer negativă.

Poziţia în sistematică: E freundii a fost încadrată în 1932 de către Werkmann şi Gillen (cit. Bergey, 1957) în genul *Citrobacter*, definit de autori prin posibilitatea utilizării citratului de sodiu ca sursă unică de carbon. În determinatorul Bergey, 1957, bacteria nu este însă considerată ca un gen aparte, ci ca o specie în cadrul genului *Escherichia.*

Genul Aerobacter

Speciile: A. aerogenes, A. cloacae

Surse de izolare: lapte, apă, canal, sol, fecale.

Condiţii de cultivare: se dezvoltă pe medii uzuale, aerobe, temperatura optimă fiind 30—37°C. Posibilitatea multiplicării la 45°C este un criteriu diferenţial faţă de *E. coli.*

Morfologie: bacili de 1—2 microni lungime şi 0,5—1 micron grosime, izolaţi, Gram-negativi. *A. aerogenes* este frecvent capsulat şi imobil, iar *A. cloacae mobil* şi necapsulat.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură mediul, formează peliculă la suprafaţă şi depozit la fundul eprubetei, degajă miros fecaloid; medii solide — colonii convexe lucioase, adesea mucoide la *A. aerogenes*, albe ca porţelanul la *A. cloacae.*

Proprietăţi biochimice: sînt rezumate în tabelul 5

TABELUL 5

Caracterele biochimice ale speciilor A. aerogenes şi A. cloacae

Specia	Glucoză	Lactoză	Zaharoză	Esculină	Amidon	Indol	Roş met.	Voges Proskauer	Citrat	H_2S	Nitraţi	Gelatină
A. aerogenes	+	+	+	+	+	V	—	+	+	—	+	—
A. cloacae	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	+	+

Patogenitate: sînt bacterii nepatogene, dar sînt luate în considerare alături de *E. coli* ca indicatori igienico-sanitari ai contaminării apelor cu fecale.

Genul Klebsiella

Specia Kl. pneumoniae

Gazda receptivă şi infecţia naturală: patogenă pentru om şi animale. La om, produce pneumonii, pleurezii, angine, rinite, otite, septicemii, infecţii urinare. La animale —

pneumonii, mamite la bovine, pneumonii urmate de septicemii la cobai.

Surse de izolare: pulmoni din cazuri de pneumonie lobară, secreţia glandei mamare în cazuri de mamite.

Examen microscopic direct: bacili Gram negativi coloraţi bipolar. În frotiuri colorate cu Giemsa se observă capsula.

Condiţii de cultivare: aerob, anaerob facultativ; temperatura optimă de dezvoltare este de 37°C; se cultivă pe medii uzuale. Păstrate la temperatura camerei şi întuneric, tulpinile sînt viabile timp de mai multe luni.

Identificare

Morfologie: bacil avînd 1—2 microni lungime, 0,8 microni grosime, cu capetele rotunjite, izolat sau în grupări diplo, capsulat, neciliat, nesporulat, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură mediul, în majoritatea cazurilor formează la suprafaţă un inel gros mucos, prin învechire mediul devine filant, uneori chiar gelatinos. Medii solide — colonii mari (3—6 mm), opace, cu suprafaţa lucioasă, bombate, confluente; se preling pe suprafaţa agarului în cazul poziţiei verticale a tuburilor. Datorită caracterului difluent al coloniilor în lichidul de condensare a culturilor vechi, se acumulează o masă mucoasă.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, lactoza, zaharoza, maltoza, salicina, arabinoza, ramnoza, xiloza, manitol, adonitol, inozitol, sorbitol şi inconstant dulcitol. Nu produce indol şi nici H_2S; reacţia Voges Proskauer în general este pozitivă, cea a roşului metil negativă; foloseşte citratul de sodiu ca sursă de carbon; reduce nitraţii; descompune inconstant ureea.

Proprietăţi antigenice: pe baza antigenilor somatici O şi a antigenilor capsulari K, s-au identificat în cadrul speciei mai multe grupe serologice. Din cauza dificultăţilor tehnice

datorite capsulei groase, existentă la majoritatea tulpinilor, antigenul somatic este greu decelabil prin examen serologic. De aceea, practic serotipul se determină pe baza antigenului capsular (B e r g e y, 1957).

Rezistența: tulpinile sînt sensibile la acțiunea antisepticelor în concentrații uzuale și la temperaturi peste 55°C. Antibioticele cele mai active față de *Klebsiella* sînt aureomicina, teramicina, polimixina, mai puțin active streptomicina și cloramfenicolul și inactive penicilina și sulfamidele.

Patogenitatea se datorește virulenței și toxicității. În condiții experimentale, este patogenă pentru animale de laborator: șoarece, cobai, iepure. La șoarece inocularea unei doze mici de cultură sau material patologic pe cale subcutanată duce la moartea animalului în 12—48 ore. Cobaiul inoculat intraperitoneal moare în 20 ore—9 zile. Iepurele este mai rezistent; inocularea intravenoasă determină la această specie localizări în diferite organe.

Alte specii din genul Klebsiella. În determinatorul B e r g e y, în acest gen mai sînt incluse două specii: *Klebsiella ozaenae* și *Kl. rhinoscleromatis*, ambele patogene pentru om. M e r c h a n t, în „Veterinary Bacteriology and Virology“ din 1967, prezintă și o specie patogenă pentru animale, *Klebsiella genitalium* descrisă de E d w a r d în 1926, care se izolează din cervix, uter și ganglionii ingvinali de la cabaline. Consecutiv infecției cu această bacterie, se instalează deseori o sterilitate permanentă. Această specie are următoarele proprietăți biochimice: fermentează lactoza, zaharoza, rafinoza, xiloza, salicina, glicerolul și adonitolul, nu fermentează inulina, nu produce indol, este roșu metil negativă, Voges Proskauer pozitivă, reduce nitrații, nu lichefiază gelatina, folosește citratul de sodiu ca sursă unică de carbon, se dezvoltă abundent în laptele turnesolat producînd o acidifiere și coagulare. În condiții experimentale, această specie este patogenă pentru cobai și iepuri producînd o infecție mortală în 12—24 ore.

Genul Paracolobactrum

Specia P. arizonae

Gazda receptivă şi infecţia naturală: produce infecţii septicemice la puii de curcă, gastroenterite şi avort la oi şi uneori enterite la om. Se găseşte în intestin la om, animale domestice, reptile, păsări.

Surse de izolare: fecale, probe de sol, apă.

Condiţii de cultivare: se cultivă pe medii uzuale, aerobe, se dezvoltă la 22—36°C.

Identificare

Morfologie: bacil de 2—4 microni lungime, 0,6—0,7 microni grosime, nesporulat, necapsulat, mobil (mobilitatea este mai accentuată la 22°C), Gram negativ.

Caractere culturale: asemănătoare cu ale salmonelelor (vezi pag. 60).

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, lactoza (în timp variabil, în general lent), salicina, nu fermentează zaharoza, dulcitolul, inozitolul. Produce H_2S abundent, nu produce indol, nu hidrolizează ureea. Reacţia roşului metil este pozitivă, reacţia Voges Proskauer negativă. Reduce nitraţii în nitriţi, utilizează citraţii ca unică sursă de carbon, lichefiază gelatina lent. Fermentarea zaharurilor şi reacţia Voges Proskauer sînt influenţate de temperatură; unele tulpini dau reacţii pozitive la 20—30°C şi negative la 37°C.

Structura antigenică: posedă antigeni somatici şi flagelari, dintre care unii sînt înrudiţi cu antigenii salmonelici.

Alte specii: în manualul B e r g e y, în afară de *P. arizonae* sînt descrise încă trei specii: *P. aerogenoides*, *P. intermedium* şi *P. coliforme*. Speciile din genul *Paracolobactrum* au o poziţie intermediară *între Escherichia şi Salmonella*. Ele sînt cunoscute şi sub numele de grupul *Arizona*. Ca argument pentru încadrarea lor într-un gen aparte de

Escherichia, s-a luat comportarea față de lactoză, pe care o fermentează mai lent.

Genul Erwinia

Specia E. amylovora

Gazda receptivă și infecția naturală: în general toate speciile din genul *Erwinia* sînt fitopatogene, dar secretă o pectinază găsită uneori în alimente (M o s s e l, 1962). Specia *E. amylovora* este patogenă pentru numeroase plante din familia *Rosaceae*. Deși considerate nepatogene pentru animale, totuși a fost semnalată prezența bacteriilor din genul *Erwinia* atît în fecalele oamenilor cu tulburări gastro-intestinale (D i e g o S u a r e z, cit. P o p o v i c i și L a z ă r, 1964), cît și în fecalele de la animale sau produse alimentare de origine animală (P o p o v i c i și L a z ă r, 1964).

Surse de izolare: plante, mai rar fecale de animale, produse alimentare de origine animală.

Condiții de cultivare: crește pe medii sintetice care conțin $(NH_4)_2PO_4$ (servește drept sursă de azot) și diferite substanțe hidrocarbonate, cît și pe medii uzuale (bulion, geloză). Se dezvoltă la temperaturi de 25—30°C, maximum 37°C, pH optim 8,8.

I d e n t i f i c a r e

Morfologie: germen coco-bacilar, 0,7—1 micron grosime și 0,9—1,5 microni lungime, izolat sau perechi, lanțuri scurte, necapsulat, nesporulat. Gram negativ, mobil (cili dispuși peritrich).

Caractere culturale: medii lichide — mediul tulbure cu peliculă fină granulară; medii solide — colonii rotunde, albe-cenușii, lucioase, margini neregulate.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, zaharoza, arabinoza, manoza, fructoza, maltoza, rafinoza, salicina; nu fermentează xiloza, ramnoza, dulcitolul; fermentează inconstant lactoza şi galactoza. Utilizează sărurile acidului citric, nu produce acetilmetilcarbinol, nu reduce nitraţii, nu dezintegrează ureea, nu produce indol.

Patogenitate: Popovici şi Lazăr (1964) cercetînd patogenitatea a 4 specii din genul Erwinia (*E. atrosep-tica, E. carotovora, E. aroidea* şi *E. cytolitica)* pentru iepuri, şoareci, cobai şi porci, constată că tulpinile studiate s-au dovedit a fi patogene. Dintre speciile examinate, *E. caro-tovora* a fost deosebit de patogenă provocînd după inocu-lare intraperitoneală la şoarece, cobai, şobolan şi porc septi-cemii mortale; celelalte specii au produs numai intoxicaţii mortale.

Genul Serratia

Specia S. marcescens (Bacillus prodigiosus)

Este un germen nepatogen, care se dezvoltă uneori pe suprafaţa unor alimente sub forma unor pete roşii (datorită pigmentului).

Surse de izolare: alimente, sol, apă.

Condiţii de cultivare: medii uzuale; aerob, anaerob facul-tativ; temperatura optimă de dezvoltare 25—30°C.

Identificare

Morfologie: bacil scurt, deseori sferic, 0,5—1 micron lun-gime, 0,5 microni grosime, izolat sau grupat în lanţuri scurte, mobil (la 20—25°C), necapsulat, nesporulat, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — bulionul tulbure, uneori formează un inel sau o peliculă roşie la suprafaţă: depozit granular; agar — colonii netede, lucioase, în 3—4

zile se colorează în roşu-portocaliu sau roşu intens, pigmentogeneza este favorizată de temperatura de 25—30°C (nu pigmentează la temperaturi peste 35°C).

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, lactoza, zaharoza, dextroza, maltoza, manitolul, nu fermentează ramnoza, dulcitolul, nu produce indol, lichefiază gelatina, reduce nitraţii, reacţia Voges Proskauer pozitivă, reacţia roşului metil negativă.

Genul Proteus

Speciile: Pr. vulgaris, Pr. mirabilis, Pr. morganii, Pr. rettgeri, Pr. inconstans

Gazda receptivă şi infecţia naturală: în general, sînt germeni saprofiţi, nepatogeni. Sînt bacterii de putrefacţie. Pot produce uneori infecţii purulente la om şi animale, enterite la pui de găină (*Pr. rettgeri*), gastroenterite şi toxiinfecţii alimentare la om.

Surse de izolare: material patologic, abcese, diverse organe, fecale, conţinut intestinal, alimente, materiale intrate în putrefacţie, apă, sol.

Condiţii de cultivare: se dezvoltă pe medii uzuale la temperaturi între 10 şi 43°C, temperatura optimă fiind de 34—37°C; aerob-anaerob facultativ.

Identificare

Morfologie: bacil de 1—3 microni lungime, 0,5—1 micron grosime, uneori filamente pînă la 20 microni lungime, nesporulat, necapsulat, foarte mobil (numeroşi cili dispuşi peritrich), Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură uniform mediul, uneori formează o peliculă fină (*Pr. vulgaris, Pr.*

mirabilis) sau un depozit vîscos *(Pr. rettgeri);* medii solide — variantele imobile produc colonii rotunde; variantele mobile prezintă fenomenul de roire (însămînţat într-un punct invadează toată suprafaţa). Fenomenul de roire poate fi inhibat prin adăugare la mediul de cultură a diferitelor substanţe (acid boric 0,1%, sulfatiazol 0,02%, alcool 1—6%, azid de sodiu 1/5000—1/10 000, ser anti-proteus etc.).

Proprietăţi biochimice: toate speciile fermentează glucoza, fructoza, galactoza şi nu fermentează lactoza, dulcitolul şi dextrina. Cele 5 specii de *Proteus* se pot diferenţia pe baza proprietăţilor biochimice (vezi tabelul 6).

Proprietăţi antigenice: variantele mobile conţin antigeni O şi H, cele imobile numai antigeni O. Pe baza structurii antigenice, s-au constituit grupe serologice, deosebindu-se de exemplu la speciile *Proteus vulgaris* şi *Proteus mirabilis*, 30 grupe. Unele tulpini de *Proteus*, în special tulpina *Proteus* OX_{19}, au antigeni comuni cu *Rickettsia prowazekii;* de aceea, serul oamenilor bolnavi de tifos exantematic aglutinează asemenea tulpini. Reacţia de aglutinare cu *Proteus* OX_{19} se foloseşte curent în diagnosticul tifosului exantematic (reacţia Weil-Felix).

Rezistenţa: la 60°C căldură umedă rezistă timp de o oră, la temperatura laboratorului 1—2 luni, la acţiunea fenolului 1% — 30 minute. Dintre antibiotice este sensibil la kanamicină, cloramfenicol, rezistent faţă de penicilină, tetraciclină şi polimixină B.

Patogenitate: toate speciile au o slabă capacitate de invazie, totuşi pot produce uneori septicemii (semnalate la om în special după introducerea tratamentelor cu antibiotice). Patogenitatea se datoreşte în parte componentelor toxice (s-au pus în evidenţă o exotoxină şi o endotoxină).

În condiţii experimentale, în special tulpinile izolate din abcese, sînt patogene pentru şoarece pe cale intraperitoneală

TABELUL 6

Diferenţierea speciilor de Proteus (după L i n s e r t şi col., 1970)

Testul biochimic diferenţial	*Pr. vulgaris*	*Pr. mirabilis*	*Pr. morganii*	*Pr. rettgeri*	*Pr. inconstans*
Glucoză	+	+	+	+	+
Glucoză plus gaz	+	+	+	V	V
Lactoză	—	—	—	—	V
Zaharoză	+	±	V	V	V
Adonitol	—	—	—	+	V
Manitol	—	—	—	+	V
Salicină	+	V	—	V	—
Dulcitol	—	—	—	—	—
Sorbitol	—	—	—	—	—
Maltoză	+	—	—	—	V
Inozitol	—	—	—	+	+
Indol	+	—	+	+	—
Voges Proskauer	—	V	—	—	+
Roşu metil	+	+	+	V	V
Citrat de NH_4	±	±	—	+	—
Malonat de Na	—	—	—	—	—
Mucat de Na	—	—	—	—	—
d-Tartrat	—	—	—	—	—
H_2S	+	+	—	—	—
Urează	+	+	+	+	—
Gelatinoliză	+	+	—	—	—
Testul KCN	+	+	+	+	+

Legendă: + = reacţie pozitivă; ± = reacţie pozitivă întîrziată sau inconstantă; V = comportare variabilă; — = reacţie negativă.

(1/200 ml), cobai — intraperitoneal sau intravenos, iepuri — subcutan (2 ml) sau iepuri nou-născuţi pe cale orală.

Genul Salmonella

Gazda receptivă şi infecţia naturală: infecţiile salmonelice (salmonelozele) se întîlnesc la om şi la numeroase specii animale, cu manifestări clinice foarte variate (enterite, avorturi, septicemii). La om, sînt relativ frecvente cazurile de toxiinfecţii alimentare provocate de salmonele. Principalele specii patogene sînt prezentate în tabelul nr. 7.

Celelalte specii incluse în schema de identificare Kauffmann White se izolează mai frecvent din toxiinfecţiile alimentare. În ţara noastră a fost semnalată prezenţa în alimente cît şi în cazuri de toxiinfecţii alimentare a diferitelor serotipuri: *S. panama, S. heidelberg, S. abony, S. senftenberg, S. derby, S. saintpaul, S. brandenburg, S. thomson, S. bovis morbificans, S. kunducki, S. chester, S. java, S. reading, S. newport, S. newington, S. worthington, S. bredeney, S. meleagridis, S. montevideo, S. livingstone, S. infantis. S. california* etc.

Surse de izolare: de la animalul viu — fecale (pentru coproculturi); de la cadavre — diverse organe, ganglioni limfatici, vezica biliară, un os lung etc.; alimente (carne, produse de carne ouă etc.), apă.

Examen microscopic direct: nu prezintă importanţă practică. În frotiuri colorate Gram se pot observa sub formă de bacili, cocobacili, Gram negativi.

Condiţii de cultivare: facultativ aerob-anaerob. Se cultivă pe medii uzuale la temperatura de 37°C.

Conduita de izolare: pentru că în materialele de examinat, îndeosebi fecale, coexistă cu alte specii microbiene

TABELUL 7

Speciile de Salmonella mai importante patogene pentru om şi animale

Grup	Specia	Gazda receptivă	Infecţia naturală
A	*S. paratyphi A*	om	febra paratifoidă
B	*S. paratyphi B*	om	febra paratifoidă
	S. typhimurium	om	toxiinfecţii alimentare
		animale (şoarece, porc, păsări, rar alte animale)	salmoneloze
	S. abortivoequina	cal	avort enzootic
	S. abortusovis	oaie	avort enzootic
C	*S. choleraesuis*	om	toxiinfecţii alimentare
		porc, rar alte specii	salmoneloze primare şi secundare
D	*S. typhi*	om	febra tifoidă
	S. enteritidis	om	toxiinfecţii alimentare
		bovine, păsări, rar alte specii	salmoneloze
	S. gallinarum	galinacee	tifoza aviară
	S. pullorum	galinacee	diarea albă (pulloroza)
E	*S. anatum*	om	intoxicaţii prin consum de ouă
		raţă	salmoneloze

TABELUL 8

Aspectul cultural al salmonelelor pe unele medii selective

Mediul	Salmonella	E. coli
Wilson Blair	colonii negre, diametru 1—2 mm, turtite, aderente, luciu metalic	colonii maron-negricioase mai groase, mucoase, uşor detaşabile, fără luciu metalic
Leifson	colonii incolore sau albicioase	colonii roşii

nepatogene sau condiţionat patogene, care se pot multiplica mai rapid în mediile de cultură inhibînd astfel dezvoltarea lor, se fac de cele mai multe ori însămînţări pe medii de îmbogăţire, se incubează la 37°C şi la intervale de 10-12-18 ore, după care se fac treceri pe medii selective.

Ca medii de îmbogăţire se pot folosi: mediul Kauffmann Müller (vezi pag. 245), mediul cu selenit acid de sodiu (vezi pag. 246) etc.

Ca medii selective se pot folosi: mediul Wilson Blair (vezi pag. 246), mediul Leifson (vezi pag. 247), mediul Istrati Meitert (vezi pag. 247), mediul Mac Conkey (vezi pag. 244).

Pe mediile selective salmonelele formează colonii relativ caracteristice.

Coloniile caracteristice se transplantează de pe mediile selective pe **un mediu de diagnostic diferenţial** cum sînt: mediul Drigalski (vezi pag. 248), geloza lactozată cu albastru bromtimol (vezi pag. 248), mediul Endo (vezi pag. 248), mediul Gassner (vezi pag. 249) etc.

Din culturile obţinute pe aceste medii se selecţionează coloniile lactozo-negative care sînt trecute în bulion şi pe

agar şi sînt examinate din punct de vedere al caracterelor morfologice, culturale, biochimice şi serologice în vederea identificării.

Identificare

Identificarea salmonelelor necesită trei etape:

I. Identificarea genului (confirmarea apartenenţei tulpinii izolate de genul *Salmonella)*

II. Determinarea grupei serologice căreia aparţine tulpina respectivă.

III. Identificarea speciei (serotipului).

I. *Identificarea genului* se bazează pe examenul caracterelor morfologice, culturale, biochimice şi serologice (cu serul polivalent „O").

Morfologie: forma bacilară sau cocobacilară de 2—3 microni lungime şi 0,6 microni grosime, Gram negativ, necapsulat, nesporulat, mobil, cu excepţia a două specii: *S. pullorum* şi *S. gallinarum.*

Caractere culturale: medii lichide — tulbură uniform bulionul (turbiditatea este mai redusă în comparaţie cu *E. coli);* medii solide — colonii rotunde, netede, lucioase, uşor detaşabile de mediu. În urma disocierii în forme R coloniile sînt uscate, cu margini neregulate.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, maltoza, manitolul, sorbitolul; nu fermentează lactoza, zaharoza, salicina şi adonitolul; fermentarea celorlalte zaharuri este variabilă. Reacţia indolului este negativă, producţia de H_2S este pozitivă, lichefierea gelatinei negativă, reacţia roşului metil în general pozitivă, reacţia Voges Proskauer negativă, testul ureazei negativ, reducerea nitraţilor pozitivă, sensibilitatea la KCN negativă, folosesc citraţii ca unică sursă de carbon.

II. *Identificarea grupei serologice* se face prin reacţia de seroaglutinare (vezi pag. 315) cu seruri antisalmonelice de grup (seruri somatice).

III. *Identificarea serotipului* (speciei) se face prin reacţia de aglutinare cu seruri antiflagelare.

Proprietăţi antigenice. În structura antigenică a salmonelelor se deosebesc: antigene somatice — O; antigene flagelare — H; antigene de suprafaţă (de înveliş) — Vi (existente numai la unele specii: *S. typhi* şi *S. paratyphi* C).

Antigenele somatice „O" conferă specificitate de grup, fiind comune mai multor specii. Pe baza antigenelor somatice salmonelele au fost clasificate de Kauffman şi White în mai multe grupe serologice notate cu literele alfabetului A, B, C etc. (tabelul nr. 9).

Antigenul flagelar „H" conferă specificitate de tip (specie). Pentru că acest antigen prezintă fenomenul de variaţie „de fază" (una specifică şi a doua nespecifică), identificarea serotipurilor nu se poate efectua decît examinînd colonii în faza specifică.

Antigenul „Vi" este un antigen de înveliş, existent la unele serotipuri de *Salmonella: S. typhi. S. paratyphi B, S. typhimurium, S. enteritidis.* Prezenţa acestui antigen conferă inaglutinabilitatea „O" tulpinilor care-l posedă, ceea ce face ca astfel de tulpini să dea reacţie negativă cu serul polivalent.

Identificarea serologică se face în general prin reacţia de aglutinare rapidă pe lamă şi în unele cazuri şi prin aglutinare lentă în tuburi.

— Aglutinarea rapidă pe lamă: într-o picătură de ser aglutinant diluat cu soluţie cloruro-sodică izotonică, conform titrului indicat pe fiolă, se face o suspensie, cu ansa, din cultura de pe mediu solid a tulpinii de identificat (cultura pe agar înclinat sau medii speciale de izolare, excep-tînd mediul Wilson Blair care modifică uneori antigenitatea). Paralel, se execută şi o reacţie martor din suspensia

TABELUL 9

Structura antigenică a unor salmonele (extras din schema Kauffmann White)

Grupa	Specia (serotip)	Antigen somatic „O"	Antigen „H", flagelar	
			faza 1	faza 2
A	*S. paratyphi*	1, 2, 12	a	—
B	*S. paratyphi B*	1, 4, 5, 12	b	1, 2
	S. typhimurium	1, 4, 5, 12	i	1, 2
	S. abortivoequina	4, 12	—	e, n, x
	S. abortusovis	4, 12	c	1, 6
	S. bredeney	1, 4, 12, 27	1, v	1, 7
	S. heidelberg	4, 5, 12	r	1, 2
	S. abony	1, 4, 5, 12	b	e, n, x
	S. brandenburg	4, 12	1, v	e, n, z
	S. chester	4, 5, 12	e, h	e, n, x
	S. reading	4, 12	e, h	1, 5
	S. kimuenza	1, 4, 12, 27	1, v	e, n, x
	S. california	4, 12	g, m, t	—
	S. derby	1, 4, 12	f, g	—
C_1	*S. choleraesuis*	6, 7	c	1, 5
	S. typhisuis	6, 7	c	1, 5
	S. thompson	6, 7	k	1, 5
	S. montevideo	6, 7	g, m, s	—
	S. livingstone	6, 7	d	1, w
	S. infantis	6, 7	r	1, 5
C_2	*S. bovismorbificans*	6, 8	r	1, 5
D	*S. typhosa*	9, 12, Vi	d	—
	S. enteritidis	1, 9, 12	g, m	—
	S. dublin	1, 9, 12	g, p	—
	S. panama	1, 9, 12	1, v	1, 5
	S. gallinarum	1, 9, 12	—	—
	S. pullorum	9, 12	—	—
E	*S. anatum*	3, 10	e, h	1, 6
	S. meleagridis	3, 10	e, h	1, w
	S. newington	3, 15	e, h	1, 6

microbiană în soluţie cloruro-sodică izotonică pentru a exclude posibilitatea aglutinării spontane.

— Aglutinarea lentă în tuburi: se repartizează cîte 0,5 ml din diluţii succesive de ser pînă la titrul limită al serului. Se adaugă în fiecare tub cîte 0,5 ml antigen. Citirea aglutinării este indicată după 20 ore de incubare la 52°C sau la 37°C în cazul aglutinării somatice şi după 2 ore la 52°C şi 4—5 ore la 37°C în cazul aglutinării flagelare.

Pentru identificarea tulpinilor de *Salmonella* se folosesc seruri de grup antisomatice şi seruri antiflagelare. În acest scop, în ţara noastră, la Institutul Pasteur se prepară unele seruri de grup, iar la Institutul Cantacuzino un set mai complet care cuprinde şi seruri antiflagelare.

Trusa de seruri a Institutului Cantacuzino conţine:

— ser polivalent „O" conţinînd anticorpi faţă de diferite fracţii antigenice (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 27);

— seruri de grup „O":

1, 2, 12 (ser „O" anti *S. paratiphy* A)
1, 4, 5, 12 (ser „O" antisalmonella B)
6, 7, 8 (ser „O" antisalmonella C)
9, 12 (ser „O" antisalmonella D)
3, 10, 15 (ser „O" antisalmonella E)

— ser anti „Vi"

— seruri anti „H" de fază specifică

Ha (ser „H" anti S. paratyphi A)
Hb (ser „H" anti S. paratyphi B)
Hc (ser „H" anti S. paratyphi C)
Hd (ser „H" anti S. typhi)
Hgm (ser „H" anti S. enteritidis)
Hi (ser „H" anti S. typhimurium)
Hr (ser „H" anti S. heidelberg)

Pentru identificarea tipurilor serologice se procedează astfel:

— aglutinare rapidă cu ser polivalent O: reacţia pozitivă arată că tulpina aparţine genului *Salmonella;* reacţia negativă nu exclude însă prezenţa unei specii de *Salmonella;* în acest caz, poate fi o specie de *Salmonella* al cărei antigen „O" este mascat de antigenul „Vi" situat la suprafaţa corpului microbian;

— aglutinare rapidă cu ser anti „Vi" se face în cazul cînd aglutinarea cu serul polivalent „O" este negativă;

— aglutinarea cu seruri de grup „O" pentru stabilirea grupei serologice din care face parte tulpina examinată;

— aglutinarea cu seruri „H" de fază specifică şi nespecifică corespunzînd speciilor care aparţin grupului „O" din care face parte tulpina de identificat.

Rezultatele obţinute prin aglutinări permit identificarea tulpinii pe baza structurii antigenice consemnate în tabelul lui Kauffmann White, pentru speciile mai frecvent izolate la noi în ţară din salmoneloze animale, din fecale, alimente şi furaje. În cazul obţinerii unor rezultate neconcludente, se poate apela pentru identificarea serotipului la centrul naţional de salmoneloze (Institutul Cantacuzino).

Pentru examenul serologic în scopul diagnosticului unor infecţii salmonelice la animale se poate recurge fie la aglutinarea rapidă, fie la cea lentă, folosind antigeni preparaţi din tulpini aparţinînd serotipurilor a căror prezenţă poate fi admisă ipotetic. În cazul salmonelozelor aviare aglutinarea rapidă se execută de regulă cu sînge integral.

Lizotipia. În cazul infecţiilor salmonelice la om, se urmăreşte şi sursa de infecţie prin lizotipie. Există scheme de lizotipie pentru *S. typhi, S. paratyphi, B, S. typhimurium.*

Rezistenţa. Salmonelele rezistă în sol pînă la 6 luni, pe obiecte pînă la 5 luni, în apă luni de zile. Prezintă un

grad marcat de rezistenţă la acţiunea substanţelor bacteriostatice din seria coloranţilor (fucsină, verde briliant, cristal violet), ceea ce permite folosirea acestora la prepararea mediilor selective. În ce priveşte acţiunea antibioticelor şi chimioterapicelor, salmonelele sînt sensibile faţă de cloromicetină, aureomicină, streptomicină, moderat sensibile faţă de sulfamide şi rezistente la penicilină.

Patogenitatea salmonelelor este condiţionată de virulenţa şi activitatea lor toxică. Virulenţa este strîns legată de prezenţa antigenului Vi (*S. typhi* şi *S. paratyphi* C). Toxicitatea se datoreşte endotoxinelor.

În condiţii experimentale, infecţia se poate reproduce la unele animale de laborator prin inoculări pe diferite căi. Dintre acestea *S. typhimurium, S. enteritidis* şi *S. choleraesuis*, administrate *per os* la şoarece, produc infecţii mortale în 2—3 săptămîni, cadavrele prezentînd leziuni macroscopice patognomonice cum sînt splenomegalia şi prezenţa de focare necrotice în ficat.

Genul Shigella

Gazda receptivă, infecţia naturală: speciile aparţinînd acestui gen sînt patogene pentru om, la care produc dezinteriile bacilare.

Surse de izolare: din fecalele oamenilor bolnavi de dizenterie acută sau cronică cît şi de la purtătorii aparent sănătoşi. Mai rar se pot izola din mediul extern, ape poluate, muşte, alimente contaminate.

Condiţii de cultivare: se cultivă pe medii uzuale la 37°C. Bacteriile se pot izola în faza acută a bolii, cînd bacilii dizenterici domină flora intestinală, prin însămînţări directe pe medii de diagnostic diferenţial (Drigalski sau geloza lactozată cu albastru bromtimol). În formele cronice şi la purtători, cînd flora saprofită este mai abun-

dentă, se recomandă însămînţarea pe medii selective care conţin săruri biliare, citrat de sodiu, hiposulfit de sodiu (se vor evita medii cu verde briliant, shigelele fiind sensibile faţă de această substanţă). Rezultate bune se obţin pe mediul Leifson şi mediul SS (vezi pag. 244, 245).

Identificare

Morfologie: bacil de 2—3 microni lungime şi 0,5—0,7 microni grosime, imobil, nesporulat, necapsulat, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — formele „S" tulbură bulionul, formele „R" sedimentează; medii solide — coloniile mici, rotunde, translucide, cu suprafaţa netedă, margini regulate (formele S) sau colonii uscate, turtite, margini neregulate (formele R).

Caractere biochimice: fermentează glucoza, inconstant lactoza, nu fermentează adonitolul, inozitolul, salicina. Nu formează H_2S, nu descompun ureea, nu folosesc citraţii, unele specii produc indol, altele nu produc. Speciile pot fi diferenţiate între ele din punct de vedere biochimic pe baza fermentării manitolului, xilozei, ramnozei, a producţiei de indol şi catalază.

Proprietăţi antigenice: posedă antigeni somatici „O" de natură glucido-lipido-polipeptidică. Există diferenţe în structura antigenică chiar în cadrul speciilor, ceea ce a justificat crearea de tipuri serologice şi întocmirea unor scheme de clasificare.

Patogenitatea se datoreşte toxicităţii; la unele specii s-au identificat exotoxine şi endotoxine, la altele numai endotoxine. Gradul de toxicitate cel mai pronunţat îl prezintă *Sh. shigae.*

Infecţia experimentală se poate reproduce la animale de laborator: şoarecele (subcutan, intraperitoneal) şi iepurele (intravenos) sînt sensibili, cobaiul mai rezistent. Cobaiul,

în urma instilării în sacul conjunctival, face o cheratoconjunctivită vindecabilă în 21 zile.

Taxonomie: conform celor mai recente clasificări, genul sau grupul *Shigella* este împărţit în 4 specii sau subgrupe: A (*Sh. dysenteriae*), B (*Sh. flexneri*), C (*Sh. boydii*), D (*Sh. sonney*), în interiorul cărora sînt cuprinse biotipuri distincte din punct de vedere biochimic şi antigenic. În genul *Shigella* era inclusă şi o specie patogenă pentru animale sub denumirea de *Sh. equirulis*. În ediţia din 1957 a manualului Bergey această specie este trecută în genul *Actinobacillus* sub denumirea *A. equi sau A. equuli*.

Diferenţierea enterobacteriaceelor

Datorită faptului că morfologia (cu excepţia prezenţei sau absenţei cililor) şi caracterele culturale ale enterobacteriaceelor sînt în majoritatea cazurilor neconcludente, principalele criterii de diferenţiere sînt cele de ordin biochimic; în numeroase cazuri proprietăţile serologice şi infecţia experimentală completează arsenalul mijloacelor de identificare a acestor bacterii.

Proprietăţile biochimice folosite în diagnosticul diferenţial se examinează printr-un număr cît mai mare de teste posibil care sînt: activitatea fermentativă faţă de cît mai multe glucide şi polialcooli, cu sau fără formare de gaz, producţiile de indol, hidrogen sulfurat, urează, gelatinază, catalază, oxidază, comportarea în cadrul reacţiilor roşului metil, Voges Proskauer, posibilitatea metabolizării unor substanţe cum sînt citratul de sodiu sau amoniu, KCN, malonatul de sodiu, mucatul de sodiu, d. tartratul etc.

Cu cît examenul biochimic este mai complet, cu atît concluziile privind genul, specia sau chimiotipul sînt mai edificatoare. În vederea facilitării examenului biochimic,

TABELUL 10

Proprietăţile biochimice diferenţiale între principalele genuri de enterobacteriacee (după L i n s e r t şi col., 1970)

	Glucoză	Lactoză	Zaharoză	Adonitol	Manitol	Salicină	Dulcitol	Sorbitol	Maltoză	Inozitol	Indol	Voges Proskauer	Roşu metil	Citrat	Na-malonat	Na-mucat	d-tartrat	H_2S	Urează	Gelatinază	Test KCN
Salmonella	+	—	—	—	+	—	V	+	+	V	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
Escherichia	+	+	—	—	+	V	V	+	+	—	+	—	+	—	—	V	V	—	—	—	—
Escherichia freundii (Citrobacter)	+	±	V	—	+	V	V	+	+	—	—	—	+	+	V	+	V	V	—	—	+
Aerobacter	+	+	+	V	+	+	—	—	+	V	—	+	—	+	+	+	—	—	V	+	+
Klebsiella	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	—	∓	—	+	+	+	+	—	+	—	+
Paracolobactrum (Arizona)	+	V	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	+	+	+	V	—	+	—	+	—
Serratia	+	∓	+	V	+	+	—	+	+	V	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+	+

Legendă: + = reacţie pozitivă; — = reacţie negativă ± = reacţie pozitivă în majoritatea cazurilor; ∓ = reacţie negativă în majoritatea cazurilor; V = comportare variabilă.

Notă: În tabel nu este cuprins genul *Proteus;* comportarea speciilor din acest gen în cadrul acelorași teste este redat în tabelul 6.

se folosesc astăzi din ce în ce mai mult mediile politrope care permit examenul concomitent al mai multor caractere (vezi pag. 294).

Reacţiile biochimice, plus examenul mobilităţii, în funcţie de numărul lor, se combină de regulă în scheme de diagnostic care pot fi minimale (un număr mic de 5—15 teste) sau maximale (un număr cît mai mare de teste). Asemenea scheme se folosesc în special în bacteriologia alimentelor, pentru care enterobacteriaceele prezintă o importanţă deosebită. Exemple de scheme minimale sînt: schema I.M.V.I.C. adică (I)ndol, (M)etil Roth (roşu metil), (V)oges Proskauer, (I)nositol, (C)itrat sau schema G.Ni.L.U.Mo.CI.S.K.O, adică (G)lucoză, (Ni)traţi, (L)actoză, (U)rează, (Mo)bilitate, (C)itrat, (S)H_2, K(CN) şi (O)xidază. Asemenea scheme nu trebuie concepute şablon şi fiecare bacteriolog îşi poate combina o schemă în funcţie de scopul urmărit (tabelul 10).

FAMILIA BRUCELLACEAE

Genul Pasteurella

Specia P. multocida (Bacillus septicaemiae haemorrhagicae, Pasteurella animalium)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: patogenă pentru numeroase specii animale; patogenitatea pentru om este discutată. Principalele infecţii ale animalelor domestice sînt: holera aviară, septicemia hemoragică a bovinelor, infecţii primare (pasteureloza) şi infecţii secundare (în pestă) la porcine, pasteureloza iepurilor, diferite pneumopatii la cîine şi pisică, pasteureloza calului (rar), pasteureloza diferitelor animale sălbatice. La oaie, infecţia pasteurelică este o raritate (un caz de mamită la această specie

produs de o tulpină de tip aviar a fost diagnosticat de Dorobanțu, 1972).

Examen microscopic direct: forme cocoide, Gram negative frecvent colorate bipolar; bipolaritatea este mai evidentă în frotiurile colorate cu albastru de metilen din organele păsărilor moarte de holeră.

Surse de izolare: organe (în special pulmonul), diferite secreții, conținutul abceselor.

Condiții de cultivare și izolare: aerob-anaerob facultativ, medii uzuale, dar se dezvoltă mai bine pe medii la care se adaugă ser sau sînge (mai ales tulpinile de origine bovină), pH optim 7,2—7,4, temperatura de incubare 37°C. Tulpinile se păstrează în bune condiții la temperatura camerei și sînt transplantabile la interval de o lună.

Identificare

Morfologie : formă cocoidă de 0,3—1,25 microni lungime; în frotiuri, izolat, uneori cîte doi sau în lanțuri scurte. Nesporulat, neciliat. În majoritatea cazurilor este capsulat; capsula este greu evidențiabilă. Cea mai adecvată metodă este colorarea negativă cu cerneală de India sau negrosic (Merchant și Packer, 1967); Gram negativ. În frotiuri din sînge sau țesuturi, colorate cu albastru de metilen sau fucsină, apare bipolar.

Caractere culturale : medii lichide — turbiditate uniformă și moderată; în culturi vechi formează o peliculă uneori și un depozit care la agitare rămîne aderent de fundul tubului răsucindu-se spre suprafață în jurul axului sub forma unui fuior; medii solide pe agar cu ser, prin examen în lumină oblică, se pot distinge trei tipuri de colonii: irizate, albăstrii și cenușii. Coloniile irizate au 1—3 mm diametru, prezintă irizații roz-gălbui, sînt constituite din bacterii capsulate și corespund tulpinilor cu un grad ridicat

de patogenitate; coloniile albastre sînt mai mici (0,5—1mm diametru), au o culoare albastră-deschisă şi sînt alcătuite din celule cu capsule foarte fine (evidenţiabile numai imunologic); coloniile cenuşii (prezente numai la unele variante de laborator) sînt tot mici (pînă la 1 mm diametru), au o culoare cenuşie-albăstruie, suprafaţa granulată şi sînt formate din germeni necapsulaţi.

Proprietăţi biochimice : există o variaţie destul de mare de la tulpină la tulpină, în ceea ce priveşte proprietăţile fermentative. În majoritatea cazurilor, fermentează glucoza, zaharoza, manoza, manitolul, fructoza, sorbitolul, galactoza; inconstant xiloza, arabinoza, dulcitolul, sorbitolul; nu fermentează rafinoza, trehaloza, ramnoza, inozitolul, dextrina, amidonul. Produce indol, nu lichefiază gelatina, produce H_2S, nu produce urează, reduce nitraţii.

Proprietăţi antigenice: între tulpinile de *P. multocida*, prin reacţii serologice, au fost identificate mai multe tipuri.

S t a m a t i n (1950) deosebeşte pe baza reacţiei de seroprotecţie pe şoarece, cît şi a altor criterii (gazda natural receptivă, patogenitatea experimentală pentru şoarece şi porumbel şi activitatea enzimatică faţă de arabinoză şi xiloză) două tipuri: tipul aviar *(avium)* şi mamifer *(mammalium)*. C a r t e r (1955), stabileşte existenţa a 5 tipuri serologice notate: A, B, C, D şi E pe baza structurii antigenice capsulare prin reacţia de hemaglutinare pasivă, iar N a m i o k a (1962) deosebeşte 12 tipuri serologice pe baza structurii antigenice somatice şi capsulare prin reacţia de seroaglutinare.

H e d d l e s t o n, într-o serie de lucrări efectuate în perioada 1968—1972, identifică şase tipuri somatice la tulpinile de *P. multocida* izolate de la păsări, tipuri care corespund clasificării lui N a m i o k a şi care nu se acoperă imunologic.

Rezistenţa. La 60°C rezistă timp de 10 minute, faţă de fenol 0,5% timp de 15 minute, iar faţă de crezol 5 minute. În carcase poate rezista pînă la 3 luni. Dintre chimio-

TABELUL 11

Corelaţiile dintre grupele O şi tipurile capsulare Carter
(după N a m i o k a şi M u r a t a, 1961)

Tulpina	Grup O	Subgrup O	Tip capsular	Tip OK	Origine	Proces patologie
3397	1	1a, 1b, 1c	A	1:A	Porc	Pneumonie
Kobe 5		1a, 1d	A		Porc	Pneumonie
TS-14		1a, 1b, 1d	A		Porc	Pneumonie
M-4		1a, 1c	—*		Oaie	Pneumonie
P-8497	2	2a	D	2:D	Porc	Pneumonie
Kobe 6		2a	D		Porc	Pneumonie
P-27		2a	D		Porc	Pneumonie
P-8	3	3a	A	3:A	Porc	Pneumonie
M-11	4	4a	—*		Oaie	Pneumonie
M-17		4a	D	4:D	Oaie	Pneumonie
TS-8	5	5a	A	5:A	Porc	Pneumonie
TF-4		5a	A		Pasăre	Holeră aviară
VA-7		5a	A		Pasăre	„
VA-8		5a	A		Pasăre	„
PA		5a	A		Pasăre	„
PB I		5a, 5b	A		Taurine	Septicemie
PB II		5a, 5b	A		Taurine	„
PB III		5a, 5b	A		Taurine	„
PB M		5a, 5b	A		Taurine	„
VB 9		5a, 5b	A		Taurine	„
VB-1	6	6a, 6b	B	6:B	Taurine	Septicemie hemoragică
656		6a, 6c	B		Taurine	„
1305-1		6a, 6d	B		Taurine	„
R-479		6a, 6b	B		Taurine	„

* netipizabilă

terapice, sulfamidele (îndeosebi sulfatiazolul) sînt active. Sensibilitatea față de antibiotice a fost cercetată în țara noastră pe un mare număr de tulpini de Popoviciu, A. (1969) și Stamatin, E. (1971). Rezultatele atestă că cele mai active s-au dovedit penicilina, cloramfenicolul și eritromicina (sînt sensibile între 87 și 100% din tulpini). Față de un număr mai redus de tulpini (43—63%), sînt active tetraciclina și polimixina. Numărul tulpinilor streptomicino-rezistente este în creștere în ultimii ani, depășind 50%.

Sensibilitatea la bacteriofagi. Pînă în prezent, s-au izolat fagi din tulpini lizogene de către Karivanov (1971), Rifkind și Pickett (1954), Kirchner și Eisenstark (1956) și Stamatin, E. (1972). În perspectivă, fagii ar putea găsi o aplicabilitate în identificarea speciei prin test fagic.

Patogenitate: P. multocida își datorește patogenitatea virulenței și toxicității (endotoxinelor). Între tulpinile de *P. multocida* există o variabilitate marcată privind virulența: se izolează tulpini foarte virulente cît și tulpini slab sau total avirulente. Virulența scade prin treceri pe medii de cultură și poate fi redobîndită prin treceri pe animale, pe embrion de găină și prin cultivare pe medii cu sînge sau ser. D.L.M. pentru șoarece și porumbel a tulpinilor virulente poate ajunge la 10^{-10} din cultura în bulion de 24 ore. În condiții experimentale este patogenă pentru șoarece, iepure și porumbel; cobaiul este mai rezistent.

Diagnosticul infecțiilor pasteurelice: izolarea unei tulpini de *P. multocida* nu este totdeauna o dovadă concludentă a unei responsabilități certe a acesteia într-un proces patologic. Pe lîngă stabilirea unei concordanțe între rezultatul examenului bacteorologic și tabloul anatomo-clinic și epizootologic este necesară verificarea patogenității tulpinii (prin determinarea D.L.M. pentru

șoarece). În cazuri deosebite se poate recurge la alte dovezi cum este cazul titrului aglutinant în R.A.L. (P o p o v i c i, I. și P o p o v i c i u, A., 1971), a determinării tipului serologic, al tipului de colonii pe agar (prin examen în lumină oblică) și al punerii în evidență a capsulei.

Specia P. haemolytica

Gazda receptivă și infecția naturală: se izolează de la bovine și ovine, de pe mucoasele căilor respiratorii și din pneumopatii în care ar putea avea un rol etiologic.

Condiții de cultivare și izolare: aerob, se cultivă pe medii speciale cu ser sau sînge, temperatura optimă 37°C.

Identificare

Morfologie: formă cocoidă asemănătoare cu *P. multocida*, imobilă, capsulată, Gram negativă.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură moderat, uniform; medii solide — colonii mici, rotunde, lucioase, semitransparente, se aseamănă cu coloniile de *Pasteurella multocida*.

Proprietăți biochimice: fermentează lactoza, maltoza, zaharoza, manitolul, glucoza, dextrina, galactoza, glicerolul, inozitolul, fructoza, rafinoza, sorbitolul și xiloza, inconstant manoza, dulcitolul, arabinoza și nu fermentează obișnuit adonitolul, salicina, ramnoza și inulina. Nu produce indol, reduce nitrații. Toate tulpinile produc o hemoliză foarte slabă în culturi primare.

Proprietăți antigenice: pe baza antigenilor capsulari s-au identificat tipuri serologice diferite.

Patogenitate: în condiții experimentale, este, în general, nepatogenă pentru șoarece și iepure și tulpinile de laborator devin total nepatogene.

Specia P. anatipestifer (Pfeifferella anatipestifer, Moraxella anatipestifer)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: produce o infecţie septicemică la bobocii de raţă.

Surse de izolare: organele păsărilor infectate.

Condiţii de cultivare: medii cu ser de cal, în atmosferă de 5 — 10% bioxid de carbon, la temperatura de incubare de 37°C.

Identificare

Morfologie: formă cocoidă, izolat, perechi sau lanţuri scurte, imobil, necapsulat, nesporulat, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate uniformă, care se intensifică după 24 ore; după cîteva zile, formează un inel la suprafaţă; medii solide — colonii mici transparente.

Proprietăţi biochimice: nu fermentează glucide, nici polialcooli. Nu produce indol, lichefiază gelatina, lichefiază serul coagulat, produce slab H_2S, nu reduce nitraţii.

Patogenitate: nu este patogen pentru animale de laborator. La bobocii de raţă poate produce o infecţie mortală în urma inoculării intravenoase.

Specia P. septicemiae

Gazda receptivă şi infecţia naturală: patogenă pentru păsări; produce septicemie la tineret (boboci de gîscă).

Surse de izolare: sînge, exsudate, organe recoltate de la animalele infectate.

Condiţii de cultivare: aerob, medii uzuale, temperatura optimă 37°C.

Identificare

Morfologie: cocobacil mic 0,3—1 micron lungime, 0,1 micron grosime izolat, frecvent perechi, imobil, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate uniformă, slabă, peliculă fină; medii solide — colonii rotunde, transparente, de tip S.

Proprietăţi biochimice: produce indol după cîteva zile, produce H_2S, fermentează glucoza, nu fermentează lactoza.

Patogenitate: experimental nepatogen pentru şoarecele alb, cobai, porumbel, găină.

Specia P. pseudotuberculosis (Bacterium pseudotuberculosis rodentium, Yersinia pseudotuberculosis)

Numele comun: bacilul lui Malassez Vignal

Gazda receptivă şi infecţia naturală: pseudotuberculoza sau rodenţioza, la cobai şi iepure, poate evolua enzootic; la alte specii ca: pisica, vulpea argintie, păsările, bovinele, maimuţele apare sporadic; la om este o infecţie rară şi poate evolua sub formă de gastroenterite, bronhopneumonii, pleurezii purulente, adenite mezenterice.

Surse de izolare: organe cu leziuni de pseudotuberculoză de la animale; de la om din abcese, fecale; s-ar putea găsi şi în sol, apă, lapte.

Condiţii de cultivare: aerob-anaerob facultativ, se cultivă pe medii uzuale; temperatura optimă este de 30°C, minima 5°C, maxima 43°C.

Identificare

Morfologie: bacilar sau cocoid, 1 micron pînă la 2 microni. Se caracterizează prin faptul că este mobil la 22°C şi imobil la 37°C, nesporulat, necapsulat, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate moderată; la 37°C bacteriile se aglutinează constituind flocoane care plutesc în lichid. La suprafaţă, se poate constitui o

membrană din care se desprind flocoane sub forma unor stalactite; medii solide — colonii mijlocii neuniforme, semiopace, nepigmentate.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, maltoza, arabinoza, xiloza, ramnoza, salicina, glicerolul şi manitolul; inconstant zaharoza. Nu produce indol, produce H_2S, roşu metil pozitiv, Voges Proskauer negativ, reduce nitraţii, reduce albastrul de metilen, nu lichefiază gelatina, nu hidrolizează ureea.

Proprietăţi antigenice: P. pseudotuberculosis posedă antigeni somatici O şi antigeni flagelari H la temperaturi sub 25°C. Pe baza antigenilor somatici, prin reacţia de seroaglutinare, s-au diferenţiat 5 grupe antigenice notate: I, II, III, IV, V.

Rezistenţa: este sensibil la acţiunea antisepticelor uzuale; temperatura de 60°C distruge germenul în 10 minute. Este sensibil la streptomicină, neomicină, tetraciclină, penicilină şi sulfamide.

Patogenitate: conţine o endotoxină care a fost obţinută prin liza celulelor parazitate de bacteriofagi. Aceasta provoacă modificări circulatorii şi moarte în 24 ore la iepure, cobai, şoarece. În doze mici, este necrozantă. În condiţii experimentale, este patogen pentru cobai, iepure, şoarece, porumbel, curcan. Inocularea intraperitoneală la cobai şi iepure produce moartea în 2—3 zile. Pe cale subcutană, cultura virulentă omoară constant cobaiul, mai rar iepurele.

Genul *Yersinia*, creat în ultimii ani, cuprinde şi specia *Y. enterolitica*, patogenă pentru om, dar prezentă şi la animale, mai ales la porc, care pare să reprezinte rezervorul natural de germeni.

Specia P. tularensis (Francisella tularensis)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: patogenă pentru om, animale sălbatice şi domestice (ovine, porcine, taurine,

cabaline, câini, pisici, păsări), produce tularemia, boală transmisibilă prin insecte (tăuni, căpuși, ploșnițe, pureci).

Surse de izolare: organe cu leziuni (ficat, ganglioni, splină).

Condiții de cultivare: aerob (nu crește în anaerobioză), temperatura optimă de dezvoltare 37°C, pH 6,8—7,3, necesită medii speciale cu ou (mediul Francis compus din 60 părți gălbenuș, 40 părți apă fiziologică, coagulat la 70°C timp de 30 minute) sau medii cu glucoză, sînge și cistină (100 ml bulion + 1,5 g agar + 1 g glucoză + 0,1 g cistină); înainte de însămînțare se adaugă sînge defibrinat în proporție 8—10%. Se dezvoltă bine în embrion de găină inoculat intravitelin. Pentru izolare în stare pură, se recomandă ca materialul patologic să fie inoculat în prealabil subcutan la cobai (infecție mortală în 3—60 zile) sau șoarece (3—14 zile). Din organele animalelor respective se fac însămînțări pe mediile amintite.

Identificare

Morfologie: forma bacilară sau cocoidă, 0,2—0,7 microni lungime și 0,2 microni grosime. Nesporulat, neciliat, uneori capsulat (capsula este vizibilă numai în frotiuri din amestec de cultură cu ser), Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — formează o peliculă la suprafață; medii solide (cu ou) — colonii mici, vîscoase, după 2—5 zile pot ajunge la 4 mm diametru; pe mediul Francis — strat de cultură mai abundent, mucos, de culoare albicioasă.

Proprietăți biochimice: fermentează slab glucoza, glicerolul, maltoza, manoza, fructoza și dextrina. Produce H_2S și catalază.

Rezistența: germenul este foarte sensibil la acțiunea factorilor fizico-chimici: este distrus în 10 minute la 58°C, în 2 minute în soluție 2% de tricrezol. În pieile animalelor

moarte de tularemie, durata conservabilităţii variază în funcţie de temperatură; la temperaturi joase, rezistă peste 1 lună, la temperaturi ridicate cîteva zile. Se conservă ani de zile în ţesut splenic păstrat în glicerină la —14°C.

Este sensibil la unele sulfamide, streptomicină şi tetracicline.

Patogenitate: în condiţii experimentale este patogen pentru şoarece, iepure, cobai, hamster şi şobolanul de bumbac.

Genul Bordetella

Specia B. bronchiseptica (Bacillus bronchisepticus, Brucella bronchiseptica, Haemophilus bronchisepticus)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: se izolează de la cîini cu boala lui Carré (jigodie) şi iniţial s-a considerat că este agentul etiologic al acestei boli pînă cînd s-a dovedit natura virotică a infecţiei, *Bordetella bronchiseptica* fiind un germen de infecţie secundară. Germenul s-a izolat şi de la porc (pneumonii, rinite), maimuţă, capră, cobai, iepure, pisică, cîine, om (Merchant şi Packer, 1963).

Surse de izolare: pulmon cu leziuni de bronhopneumonie, secreţii nazale, exsudat bronşic de la canine cu boala lui Carré.

Condiţii de cultivare: aerob, se dezvoltă pe medii la care se adaugă ţesuturi animale sau plasmă; pH 7—7,2. Condiţii convenabile oferă mediul Bordet-Gengou. Temperatura de incubare 37°C. La izolare creşte slab; cultura devine vizibilă după 24 ore.

Identificare

Morfologie: bacil mic de 1 micron lungime, 0,2—0,3 microni grosime, izolat sau în grupări diplo. În medii lichide este uneori dispus în lanţuri. Mobil, are cili aşe-

zaţi peritrich. Nesporulat, necapsulat, Gram negativ, frecvent bipolar.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate uniformă cu depozit granular după 72 ore incubare; medii solide — cultură fină, colonii mici, lucioase. Prin învechire, coloniile cresc în diametru pînă la 6—8 microni, devin strălucitoare şi opalescente la lumina reflectată.

Proprietăţi biochimice: nu fermentează substanţele hidrocarbonate, nu produce indol, nici H_2S, comportarea faţă de nitraţi este diferită; unele tulpini reduc nitraţii, altele nu. Alcalinizează laptele turnesolat în 1—2 zile, hidrolizează ureea, foloseşte citraţii ca sursă unică de carbon. Pe agar cu sînge se dezvoltă repede, este hemolitic (pentru globulele roşii de cîine, iepure şi cobai).

Proprietăţi antigenice: are antigeni comuni cu *B. pertussis* şi *B. parapertussis.*

Rezistenţa: este distrus la temperatura de 55°C în 20 minute, este sensibil la lumină, uscare şi dezinfectanţi uzuali.

Patogenitate: posedă o toxină asemănătoare cu toxina secretată de *B. pertussis* care este neutralizată de serurile antipertussis.

Alte specii: B. pertussis agentul tusei convulsive la om şi *B. parapertussis* de asemenea patogen pentru om, producînd infecţii asemănătoare cu tusea convulsivă.

Genul Haemophilus

Specia H. suis

Gazda receptivă şi infecţia naturală: bacteria este considerată ca un epifit al căilor respiratorii anterioare. Patogenitatea este condiţionată de acţiunea primară a virusului

influenţei. Bacteria se izolează din cazuri de influenţă a porcului.

Surse de izolare: sînge, pulmon, cord şi alte organe de la porcii cu influenţă.

Condiţii de cultivare: strict aerob, temperatura optimă 37°C, pH 7,2. Pe medii de cultură se dezvoltă numai în prezenţa factorilor de creştere V şi X: factorul X (hemina) este prezent în hemoglobină, este rezistent la căldură şi în consecinţă se pot folosi medii cu sînge încălzite; factorul V (nucleotidul fosfo-piridinic) este prezent în sucul de fructe (tomate, lămîi, banane), în globule roşii proaspete; întrucît este sensibil la acţiunea căldurii se adaugă după sterilizare. Se cultivă pe medii speciale ca agarul şocolat, mediul Levinthal şi Fildes.

Identificare

Morfologie: cocobacil cu dimensiuni reduse de 0,5—1,5 microni lungime şi 0,2—0,3 microni grosime, dispus în lanţuri scurte, grămezi sau izolat. În culturi vechi este cocoid; unele tulpini sînt capsulate. Este imobil, nesporulat, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate slabă; medii solide — pe agar şocolat colonii mici, cu diametrul de 1—2 mm, rotunde, cenuşii, semitransparente. Pe agar sînge — colonii mici, nehemolitice.

Proprietăţi biochimice: pentru studiul caracterelor biochimice este neapărat necesară prezenţa factorilor X şi V în medii. Activitatea zaharolitică este slabă; după unele date fermentează maltoza, slab zaharoza şi manitolul şi nu fermentează glucoza, lactoza, zaharoza, dulcitolul, glicerolul, inulina şi arabinoza. Nu produce indol, nu produce H_2S, reduce nitraţii, nu lichefiază gelatina.

Proprietăţi antigenice: există relaţii antigenice între *H. suis* şi *H. influenzae* (patogen pentru om). În cadrul speciei există, după unii autori, heterogenitate antigenică.

Alte specii din genul *Haemophilus*, asemănătoare din punct de vedere morfologic şi cultural cu *H. suis*, toate necesitînd pentru cultivare prezenţa factorilor de creştere X şi V, dar deosebindu-se prin gazda receptivă şi proprietăţi biochimice, sînt:

H. influenzae, patogen pentru om, de la care se izolează din infecţiile căilor respiratorii unde se găseşte în asociaţie cu virusul influenţei. Speciile care interesează patologia veterinară în afara speciei *H. suis*, descrisă mai sus, sînt următoarele:

H. canis se găseşte în secreţia prepuţială la cîine. Se deosebeşte de celelalte specii prin faptul că pentru dezvoltare necesită numai prezenţa factorului X, nu şi a factorului V, că fermentează glucoza, fructoza, galactoza, manitolul, zaharoza şi xiloza şi produce indol;

H. gallinarum se găseşte ca germen de asociaţie în coriza infecţioasă a păsărilor. Pentru dezvoltare, factorul X (hemina) nu este esenţial şi se poate cultiva bine, după Gregory citat de Merchant şi Packer (1967) pe medii cu extract de drojdie de bere. Administrat intranazal la pui, se reproduce infecţia cu caracteristici anatomo-clinice asemănătoare cu infecţia naturală;

H. ovis se izolează din infecţii respiratorii (bronhopneumonii) de la oaie. Din punct de vedere biochimic fermentează sorbitolul, rafinoza, fructoza, galactoza, glucoza, maltoza, manitolul, manoza şi zaharoza, mai slab lactoza şi xiloza; nu fermentează inozitolul, salicina, inulina, arabinoza şi ramnoza. Nu produce indol, reduce nitraţii. Administrat intranazal la cobai, produce o infecţie mortală cu durata de 4 zile;

H. cuniculi se izolează din abcese de la iepure. Fermentează glucoza, fructoza, manitolul, maltoza, lactoza, zaha-

roza, galactoza, salicina, dextrina și xiloza; nu fermentează dulcitolul și inulina. Nu produce indol, nu lichefiază gelatina.

Genul Actinobacillus

Specia A. lignieresii

Gazda receptivă și infecția naturală: este agentul etiologic al actinobacilozei întîlnită cel mai frecvent la bovine, relativ frecvent la ovine și accidental la alte specii.

Surse de izolare: puroiul din leziuni.

Examen microscopic direct: la examenul microscopic direct al puroiului între lamă și lamelă se observă formațiuni caracteristice avînd aspectul unor rozete numite tufe actinobacilare. Spre deosebire de tufele actinomicotice care sînt constituite din elemente măciucate, în cazul actinobacilozei tufele sînt constituite din elemente care au aspectul petalelor unei flori. Frotiurile din materialul purulent colorate prin metoda Gram sînt deseori neconcludente sau permit observarea unor rare forme cocobacilare, Gram negative.

Condiții de cultivare: aerob-anaerob facultativ, se dezvoltă bine în bulion și pe agar; izolarea este facilitată prin adăugarea serului de cal în mediile de cultură, care nu este însă neapărat necesar. Un alt element care ușurează izolarea este mojararea prealabilă a puroiului înainte de însămînțare. Se dezvoltă la 37°C în 24 ore (cîteodată în culturi primare abia în 48 ore). Transplantarea tulpinilor din colecții trebuie făcută la 10—14 zile.

Identificare

Morfologie: forme bacilare sau coco-bacilare 0,4/1,15—1,25 microni, foarte rare forme filamentoase. Este imobil, nesporulat, necapsulat, Gram negativ, frecvent bipolar.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate moderată, se dezvoltă deseori granular, aglutinat; medii solide — colonii semiopace, neuniforme, cu diametru de 2—3 mm, nepigmentate.

Proprietăţi biochimice: fiecare tulpină fermentează numeroase glucide şi polialcooli. Nici una din aceste substanţe nu este însă descompusă de toate tulpinile. Majoritatea tulpinilor (peste 90%) fermentează glucoza, levuloza, galactoza, zaharoza şi d. manitolul. Mai puţin de 25% din tulpini fermentează arabinoza, xiloza, trehaloza, lactoza, ramnoza, rafinoza, salicina, inulina, dextrina, dulcitolul, izodulcitolul şi inozitolul. Reacţii constant pozitive pentru toate tulpinile sînt: producţia de uree şi reducerea albastrului de metilen. Teste constant negative sînt: producţia de indol, de catalază, reacţia roşului de metil, reacţia Voges Proskauer. Este neproteolitic, nehemolitic. Majoritatea tulpinilor (peste 90%) produc H_2S (în cantităţi mici) şi reduc nitraţii (Rădulcănescu, 1964).

Proprietăţi antigenice: tulpinile sînt antigenic neomogene, neexistînd deocamdată suficiente argumente pentru constituirea unor grupe serologice. Se pare că germenul prezintă unele înrudiri antigenice cu *A. mallei*, cu *E. coli* şi probabil şi cu alte bacterii Gram negative (Rădulcănescu şi Anghelescu 1964, 1972).

Rezistenţă: la 52°C căldură umedă, rezistă o oră şi jumătate, la 60°C rezistă 10 minute şi la 100°C rezistă 1 minut. Dintre dezinfectante cel mai activ este sublimatul, al cărui coeficient fenolic pentru *A. lignieresi* este de 235,094; dintre antibiotice, cele mai active sînt cloramfenicolul şi teramicina.

Patogenitate: este slab patogen pentru animale de laborator. Unele tulpini omoară şoarecele pe cale intraperitoneală în doze mari (0,5 ml cultură integrală în bulion de 24 ore).

Specia A. equuli (Shigella equirulis, Bacterium viscosum equi)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: se găseşte ca saprofit în tractusul intestinal la cabaline. La mînji, poate fi izolat din leziuni de pielonefrită, poliartrită, piosepticemie, la iepe din cazuri de avort, iar la cai bătrîni se izolează din anevrisme verminoase.

Sursa de izolare: lichid sinovial, puroi, sînge, avortoni.

Condiţii de cultivare: este aerob-anaerob facultativ, se dezvoltă mai bine în medii ce conţin infuzie proaspătă de carne, temperatura optimă este 37°C, nu se dezvoltă la 45,5°C. Viabilitatea în culturi este de 7 zile.

Identificare

Morfologie: bacil mic de 0,3—0,4 microni lungime, 0,5—0,8 microni grosime, izolat sau grupat în lanţuri sau filamente. Se consideră că este necapsulat deşi unii autori atestă prezenţa unei capsule. Este neciliat, nesporulat, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — în cultură se formează mase ce plutesc în mediu, se depun pe pereţii şi fundul eprubetei. Cu timpul se formează o peliculă la suprafaţă şi uneori mediul devine vîscos. Medii solide — pe agar înclinat cultură vîscoasă, albă-cenuşie care acoperă suprafaţa. Pe agar infuzie carne şi peptonă, creşte bine în 48 ore, coloniile au diametrul de 3—6 mm şi sînt de tip R, au suprafaţa lobată şi mucoasă; în subculturi predomină colonii de tip S.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, fructoza, xiloza, lactoza, galactoza, maltoza, zaharoza, manitolul şi rafinoza, inconstant dextrina şi nu fermentează ramnoza, dulcitolul, sorbitolul şi inozitolul. Nu produce indol, produce H_2S, nu hidrolizează ureea, nu metabolizează citratul de sodiu, reduce nitraţii şi este nehemolitic.

Proprietăţi antigenice: tulpinile sînt antigenic heterogene şi dau reacţii de aglutinare sau precipitare pozitivă numai cu serul homolog.

Rezistenţa: se distruge uşor sub acţiunea antisepticelor; la 60°C rezistă 15 minute.

Patogenitate: este condiţionat patogen pentru cabaline în condiţii naturale şi experimentale. La mînji, se poate reproduce infecţia prin inoculare subcutană. Este practic nepatogen pentru iepure, cobai şi şobolan.

Specia A. mallei (Bacillus mallei, Malleomyces mallei, Pfeifferella mallei)

Numele comun bacilul morvei.

Gazda receptivă şi infecţia naturală: infecţia denumită morvă se întîlneşte la solipede şi om, rar la carnasiere. Este o zoonoză, omul infectîndu-se de la animale bolnave.

Surse de izolare: numai din leziuni de morvă.

Examen microscopic direct: forme bacilare şi cocobacilare Gram negative.

Condiţii de cultivare: este aerob. Se cultivă pe medii glicerinate (bulion, agar şi cartof glicerinat) pH 6,6. Se dezvoltă la 25—40°C, temperatura optimă fiind 37°C. Viabilitatea germenului în culturi este de 30—60 zile.

Identificare

Morfologie: formă bacilară de 0,3—0,5 microni grosime şi 1,5—4 microni lungime, cu capetele rotunjite. În culturi vechi, polimorfismul este accentuat, coexistînd forme coco-bacilare, bacilare şi filamentoase. Nesporulat, neciliat, necapsulat, Gram negativ.

Caractere culturale: bulion glicerinat — mediul tulbure, uneori cu o peliculă fină la suprafaţă; în culturile mai

vechi, mediul se colorează în brun. Agar glicerinat — coloniile rotunde, lucioase, opace, care cu timpul devin gălbui. Cartof glicerinat — aspect relativ caracteristic, după 48 ore de incubare, apar colonii semiopace, bombate, lucioase, de culoare gălbuie, avînd aspectul picăturilor de miere. Ulterior, coloniile se colorează în șocolatiu.

Proprietăți biochimice: în general nu fermentează substanțele hidrocarbonate; numai unele tulpini fermentează slab glucoza și salicina după o incubație prelungită. Nu produce indol, nu reduce nitrații. Reacțiile roșului metil și Voges Proskauer sînt negative, produce cantități mici de H_2S, nu lichefiază gelatina.

Proprietăți antigenice: pentru diagnosticul curent este considerat practic omogen antigenic. Reacția alergică (malenarea) și RFC sînt folosite pentru diagnosticul curent și pentru acțiunea de depistare a morvei în efectivele de cabaline. Prin studiul serologic al unui număr mare de tulpini, prin reacția de aglutinare și RFC s-au identificat două tipuri serologice.

Rezistența: în general este sensibil la acțiunea factorilor fizico-chimici. Este distrus la 55°C în 10 minute. Dintre dezinfectante, hipocloritul, clorura mercurică sînt cele mai active. Dintre antibiotice s-a constatat că streptomicina dă rezultate în tratamentul infecției la om, iar dintre chimio-terapice sulfatiazolul (Munțiu, 1943, 1948).

Patogenitatea: se datorește virulenței și toxicității; posedă endotoxine (glucido-lipide și nucleoproteine). În organism, secretă substanțe alergizante. În condiții experimentale, este patogen pentru animale de laborator (cobai, hamster, iepure), iar dintre animalele domestice, pentru cal, măgar și mai puțin cîine. La cobai, tulpinile virulente inoculate intraperitoneal produc în cîteva zile (durata evoluției este în funcție de doză) o peritonită și orhivaginalită caracteristică, cunoscută sub denumirea de fenomenul lui Strauss.

Genul Moraxella

Specia M. bovis

Gazda receptivă şi infecţia naturală: la bovine, produce cheratoconjunctivită. În ţara noastră, microbul a fost izolat pentru prima oară de Volintir în 1971.

Surse de izolare: secreţii conjunctivale, material raclat din ulcer cornean.

Examen microscopic direct: în frotiu din materialul purulent sau din materialul raclat din ulcere corneene colorate prin metoda Gram, se observă diplobacili deseori cocoizi, intra- sau extracelulari, Gram negativi.

Condiţii de cultivare: pentru izolare, însămînţarea pe agar cu sînge şocolat, pH 7,2—7,5, dă cele mai bune rezultate. Germenul se dezvoltă bine şi pe agar cu sînge, agar cu ser, bulion cu sînge. Temperatura optimă este 36°C.

Identificare

Morfologie: bacil de 1,5—2 microni lungime şi 0,5—1 micron grosime. Obişnuit, se găseşte în perechi, uneori şi în lanţuri scurte, capsulat, nesporulat, imobil, Gram negativ.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate slabă, depozit abundent; agar cu sînge — după 24 ore, apar colonii mici, rotunde, transparente, albe-cenuşii, înconjurate de o zonă subţire (1,5 mm) de hemoliză beta mai intensă pe medii cu sînge de cal.

Proprietăţi biochimice: nu fermentează substanţele hidrocarbonate, nu produce indol, nu reduce nitraţii, lichefiază gelatina, nu produce H_2S.

Rezistenţa: la temperatura de 58—59°C se distruge în 5 minute. Este sensibil faţă de eritromicină, tetraciclină şi cloramfenicol (Volintir, 1971).

Patogenitate: în condiţii experimentale, este în general nepatogen pentru animale de laborator. Leziuni tipice de cheratită s-au reprodus la bovine cu culturi de 24 ore de către Jones şi col. (cit. Merchant şi Packer, 1967). Germenul posedă o toxină hemolitică şi o toxină necrotică. Prin inocularea ambelor toxine de *M. bovis,* se pot reproduce leziuni de cheratită şi conjunctivită la iepuri şi viţei.

Genul Sphaerophorus

Specia Sph. necrophorus (Necrobacterium necrophorum, Bacterium necrophorum, Actinomyces necrophorus)

Numele comun: bacilul necrozei (bacilul lui Schmorl)
Gazda receptivă şi infecţia naturală: Sphaerophorus necrophorus este agentul etiologic al necrobacilozei, infecţie ce se întîlneşte la diferite specii şi se caracterizează prin procese necrotice şi purulente, cu diverse localizări. Formele anatomo-clinice care pot fi întîlnite la diverse specii animale sînt: la viţei — leziuni difteroide faringiene, bucale, focare necrotice în pulmon; la bovine adulte — focare purulente în pulmon, abcese şi ulceraţii în stomac, leziuni difterice pe mucoasa bucală, intestinală, a vulvei şi anusului, panariţii interdigitale, gangrena uscată a mameloanelor; la porcine — ulceraţii ale mucoasei bucale, necroze cutanate ale membrelor, metastaze hepatice şi renale, ulceraţii intestinale care complică pesta porcină; la ovine — plăgi ulcerative cuprinzînd buzele, nasul, leziuni (ulceraţii) ale extremităţii membrelor, abcese hepatice mai frecvent la mieii nou-născuţi; la cabaline — javartul şi complicaţii ale plăgilor; la cîine — dermite flegmonoase interdigitale; la iepure — ulceraţii întinse ale buzelor, nasului, necroza limbii, pleurezii, pericardită, artrite, abcese

pulmonare; la om — abcese, artrite, leziuni necrotice faringiene, pulmonare, flegmoane amigdaliene, pleurezii purulente, osteomielite, colită ulceroasă, meningite.

Surse de izolare: materialul necrotic şi purulent din leziuni, suprafaţa mucoaselor cavităţii bucale şi faringiene a animalelor sănătoase (bovine, ovine), fecale.

Condiţii de cultivare: este strict anaerob. Pentru izolare se recomandă ca mediu lichid, mediul Rosenow cistinat, iar ca mediu solid pentru însămînţare în suprafaţă mediul VL glucozat 0,2% care în momentul întrebuinţării se amestecă cu următoarea soluţie: verde briliant 0,048 g şi azid de sodiu 0,600 g la 1 000 ml apă distilată. Pentru cultivarea în profunzime, rezultate bune se obţin pe mediul VL semisolid. Mediile se însămînţează abundent, în cazul abceselor, direct cu materialul purulent, iar în cazul organelor sau al ţesutului muscular se recoltează fragmente, se triturează, apoi se însămînţează. Se recomandă însămînţarea a 2—3 tuburi pentru o probă. Incubarea se face timp de 72 ore la 37—38°C. Viabilitatea în culturi este redusă. Pentru conservare, F i e v e z (1963) recomandă cultivare în mediul Rosenow prin transplantări la 3—4 săptămîni cu o cantitate mare din cultură veche (o pipetă Pasteur). Cea mai bună metodă de conservare este liofilizarea.

I d e n t i f i c a r e

Morfologie: în leziuni cît şi în culturi, germenul apare deseori sub formă de filamente lungi (10—100 microni lungime şi 0,7—2 microni grosime), drepte sau flexuoase. Pe traiectul filamentelor se observă granule metacromatice. Mai rar, se observă elemente neregulate, groase, cu protoplasma granulară conţinînd vacuole. Aceste elemente pot prezenta umflături fuziforme. În leziuni vechi sau culturi vechi, domină forme scurte de 2—3 microni. Se colorează

bine în culturi tinere, mai slab în culturi vechi. Este nesporulat, neciliat, necapsulat, Gram negativ.

Caractere culturale: în geloza Veillon — colonii mici, lenticulare, albe-cenușii, care apar după 48 ore de incubare; geloza sînge — după 48 ore de incubare apar colonii discrete cu diametrul de 1 mm, ușor transparente, rotunde, plate sau ușor bombate, cenușii-albăstrui, înconjurate de o zonă de hemoliză de 1—3 microni. Prin învechire, coloniile apar mai plate, mai uscate, cu un centru opac mai gros înconjurat de o zonă mai transparentă. Fievez (1963) deosebește pe geloza-sînge, pe baza hemolizei și a aspectului cultural, mai multe tipuri de colonii: A — hemolitice de tip S; B — slab hemolitice de tip R; AB — cu aspect intermediar între A și B; C — nehemolitice.

Togoe (1972) observă în culturi tinere la unele tulpini, prin examen cu lupa, colonii cu marginea bine conturată, hexagonală sau pentagonală, cu centrul bombat; prin învechire coloniile devin ombilicate și conturul se rotunjește. În medii lichide — turbiditate uniformă; depozitul este de regulă granular.

Proprietăți biochimice: fermentează glucoza, maltoza glicerolul, mai slab lactoza, galactoza, fructoza, arabinoza și manitolul; nu fermentează xiloza, ramnoza, manoza, rafinoza, inulina, dulcitolul, salicina, dextrina, adonitolul, sorbitolul, inozitolul. Este slab proteolitic, lichefiază serul coagulat după 10 zile de incubare, dar nu lichefiază gelatina și nici albușul de ou coagulat. Produce indol și H_2S, nu reduce nitrații, reacțiile Voges Proskauer și roșu metil sînt negative; reduce albastrul de metilen; proba catalazei este slab pozitivă. În general, hemolizează globulele roșii de om, cal, iepure, găină, porumbel; nu hemolizează globulele roșii de bou și oaie.

Proprietăți antigenice: datele privind structura antigenică sînt contradictorii; unii autori au găsit că toate tulpinile de *Sph. necrophorus* sînt identice din punct de ve-

dere al structurii antigenice, alţii deosebesc în cadrul speciei mai multe tipuri antigenic distincte.

Rezistenţa: este distrus în 15 minute la 55°C; este sensibil la acţiunea antisepticelor şi dezinfectantelor în concentraţii uzuale. Dintre antibiotice şi sulfamide (după F i e v e z, 1963) *Sph. necrophorus* este sensibil la aureomicină, penicilină, cloromicetină, teramicină, tetraciclină, novobiocină, polimixină B, eritromicină, spiramicină, furadantin, furacin, sulfatiazol, trisulfamidă şi rezistent faţă de dihidrostreptomicină, neomicină, kanamicină, oleandomicină şi vyomicină.

Patogenitatea: se datoreşte mai ales toxicităţii; secretă o exotoxină care inoculată intradermic la iepure produce edem; posedă şi o endotoxină (corpii microbieni omorîţi, inoculaţi subcutan la iepure sau cobai, produc necroză).

În condiţii experimentale *Sph. necrophorus* este patogen pentru iepure la care în doză de 0,2—0,4 ml cultură în mediu lichid de 24 ore provoacă o infecţie mortală, iar în aproximativ aceleaşi doze pe cale subcutană o infecţie locală inconstant mortală; la şoarece, în doză de 0,25 ml intraperitoneal, produce o infecţie mortală. Pe cale subcutanată la şoarece şi iepure dezvoltă o inflamaţie fibrino-necrotică caracteristică. Cobaiul este mai rezistent în comparaţie cu iepurele şi cu şoarecele.

Taxonomie: cu privire la speciile din genul *Sphaerophorus* există trei puncte de vedere:

— genul cuprinde 18 specii (B e r g e y, 1957);

— există numai două specii: *Sph. necrophorus* — patogen pentru animale şi *Sph. funduliformis* — patogen pentru om (P r e v o t, 1957);

— toate tulpinile sînt încadrabile într-o singură specie *Sph. necrophorus* (F i e v e z, 1963, M e r c h a n t şi P a c k e r, 1967), deosebindu-se eventual mai multe tipuri pe baza unor criterii ca: tipul de hemoliză, producţia de lecitinază etc.

Genul Brucella

Specii: Br. melitensis, Br. abortus, Br. suis, Br. neotomae, Br. ovis, Br. canis

Gazde receptive şi infecţii naturale: brucelele sînt bacterii obligatoriu parazite, care produc îmbolnăviri la animale şi om, numite bruceloze. *Br. abortus* este patogenă pentru taurine; *Br. suis* este patogenă pentru porc, iepurele de cîmp şi ren; *Br. melitensis* este patogenă pentru oaie şi capră; *Br. ovis* este patogenă exclusiv pentru oaie şi produce o orhiepididimită la berbeci; *Br. canis* este patogenă pentru cîine, iar *Br. neotomae* pentru şobolanul de pădure. Speciile *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis* şi *Br. canis* sînt patogene şi pentru om.

Surse de izolare: de la taurine — avortoni (conţinutul stomacului glandular, splină, ficat, pulmon), învelitori fetale, loşii, sperma, ser fiziologic cu care s-au făcut prealabile spălături prepuţiale, lapte, organe recoltate la autopsie (ganglioni limfatici, organe genitale, uger); de la porc — fetuşi, învelitori, secreţii vaginale, sperma, testicule; de la berbec — testicule cu leziuni; de la iepurele de cîmp — organe cu leziuni macroscopice.

Examen microscopic direct: bacteriile se pot observa la microscop în frotiuri din material patologic, colorate prin metode selective, care colorează brucelele diferit de restul florei bacteriene (vezi pag. 226).

Condiţii de cultivare: bacteriile nu se dezvoltă pe medii uzuale. Rezultate bune se obţin pe medii glucozate 1% şi glicerinate 2%, pH optim 7—7,2. Temperatura optimă de incubare este 37°C. Este un germen aerob-anaerob facultativ. Speciile *Br. abortus* şi *Br. ovis* la izolare necesită o atmosferă îmbogăţită 5—10% în CO_2. După cîteva transplantări, aceste specii se dezvoltă bine şi în

aerobioză. Pentru a se izola dintr-un material care conţine o floră mixtă, însămînţarea se face după o prealabilă tratare cu soluţie 2,5% KOH timp de 30 minute (după V o n d e r Aa şi col. 1965, cit. P o p, 1971). Pentru izolare se pot face şi inoculări pe embrioni de găină de 5—6 zile (0,1—0,2 ml intravitelin). La 5—6 zile de la inoculare, se recoltează steril sacul vitelin, se triturează şi suspensia se însămînţează pe medii de cultură.

I d e n t i f i c a r e

Morfologie: bacteriile au formă cocoidă (0,3—0.4 microni) sau bacilară (1—2 microni), sînt dispuse izolat, perechi sau în lanţuri. Sînt nesporulate, neciliate, necapsulate, Gram negative.

Caractere culturale: medii lichide — după cîteva zile de incubare, prezintă o turbiditate moderată cu depozit cenuşiu, uneori inel; mediul se alcalinizează pînă la pH 8; medii solide: pe agar glicero-glucozat — colonii rotunde, opace, lucioase; pe cartof glicerinat cultura devine vizibilă în 24—48 ore; suprafaţa lucioasă, prin învechire, se colorează în brun-şocolatiu. La izolare, culturile sînt de tip S, exceptînd *Br. ovis* şi *Br. canis;* în condiţii de laborator disociază şi pot apare forme R sau M.

Diferenţierea tipurilor culturale se poate face pe baza următoarelor criterii:

— aspectul coloniilor pe medii gelozate, prin examen microscopic direct în lumina oblică: coloniile de tip S sînt albăstrui, cele de tip R sînt albe, mate, strălucitoare, granulare, iar cele de tip M gălbui, cu suprafaţa netedă;

— dezvoltarea în bulion — coloniile de tip S tulbură uniform bulionul, cele de tip R formează la suprafaţă o peliculă şi un sediment pulverulent, iar cele de tip M o peliculă şi un sediment vîscos;

— stabilitatea și caracterul suspensiilor în ser fiziologic (S-omogene, stabile; R și M — granulare sau floconoase, instabile);

— termoaglutinarea la 90°C (testul Burnet) — suspensiile culturilor de tip S nu aglutinează, în timp ce ale celorlalte tipuri aglutinează;

— aglutinarea în tripaflavină (testul Pampana) este proba care se utilizează mai frecvent pentru diferențierea tipurilor culturale. Se poate executa în tuburi folosind 0,1 ml soluție 1:1 000 tripaflavină și 1 ml din suspensia de brucele sau rapid pe lamă (o picătură soluție 1/500 tripaflavină și o picătură densă de suspensie). În cazul formelor S suspensia este stabilă, în cazul celorlalte forme se produce aglutinare.

În culturi, la temperatura camerei, se conservă timp îndelungat. Tulpinile din colecții se transplantează la interval de 2 luni.

Proprietăți biochimice: proprietăți fermentative slabe; metabolizează glucoza, dar aciditatea nu este detectabilă datorită neutralizării prin NH_3 rezultat din metabolismul proteic; nu produc indol, reduc nitrații, nu lichefiază gelatina, reacțiile Voges Proskauer și a roșului metil sînt negative; producțiile de urează și H_2S diferă în funcție de specie.

Rezistența: bacteriile sînt sensibile față de factorii fizici și chimici; se distrug în cursul pasteurizării laptelui în 10—15 minute, nu rezistă la uscăciune (se distrug în carnea sărată ținută la rece), sînt sensibile față de antisepticele de uz curent (formolul 0,5% le distruge în 5 minute, sublimatul 0,01% — în cîteva minute, acidul clorhidric 1% — în 20 minute). Se conservă un timp relativ îndelungat în produse patologice (în avortoni păstrați la 4°C timp de 75 zile), organe, diferite secreții, sol (20 zile), apă (în apă fiziologică sterilă 3 luni); rezistă la putrefacție. Brucelele sînt relativ sensibile *in vitro* la antibiotice

și chimioterapice. Activitatea antibioticelor este în general brucelostatică, iar streptomicina și cloramfenicolul sînt bactericide (P a r n a s și col., 1965, cit. P o p, 1971).

Proprietăți antigenice: brucelele au antigeni comuni dar prin reacția de aglutinare cu seruri monovalente s-au pus în evidență la speciile *Br. melitensis*, *Br. abortus* și *Br. suis* doi antigeni cu expresie de tip (specie): A *(abortus)* și M *(melitensis)* repartizați în proporții diferite la cele trei specii: antigen A — la *Br. abortus* 95%, *Br. suis* 60% și *Br. melitensis* 5%, iar antigen M — la *Br. abortus* 5%, *Br. suis* 40% și *Br. melitensis* 95%.

Folosind reacția de aglutinare cu seruri monospecifice obținute prin adsorbție, cele trei specii se pot diferenția astfel: *Br. abortus* și *Br. suis* aglutinează cu serul A, iar *Br. melitensis* cu serul M. *Br. ovis* se deosebește de celelalte specii prin prezența antigenului R.

Reacții serologice folosite în diagnosticul infecțiilor brucelice: în practică se execută reacțiile de seroaglutinare lentă (vezi pag. 318), iar la animalele în lactație reacția inelară din lapte (vezi pag. 321). În mod curent, pentru diagnosticul brucelozei la bovine și porcine, în laboratoarele veterinare din țara noastră, se efectuează trei diluții în cazul reacției seroaglutinării lente: 1/25, 1/50 și 1/100. Se consideră pentru bovine o reacție dubioasă cînd titrul aglutinant este 1/50 și o reacție pozitivă cînd titrul aglutinant este 1/100 sau mai mult; pentru porcine, un titru aglutinant de 1/25 indică o reacție dubioasă, iar un titru de 1/50 sau mai mult, o reacție pozitivă. Pe lîngă reacțiile amintite, în diagnosticul brucelozei se mai pot folosi RFC și imunofluorescența.

Patogenitatea se datorește mai mult virulenței; germenii persistă în circulație și în organe, unde acționează prin endotoxine (substanțe de natură glucido-lipido-polipeptidică). În condiții experimentale, animalele de laborator cele mai sensibile sînt cobaiul și hamsterul; la cobai in-

fecţia poate fi reprodusă pe orice cale de inoculare. După inocularea intraperitoneală, infecţia evoluează acut sau cronic, în funcţie de doză. Pentru diagnostic, se inoculează cîte doi cobai subcutan sau intraperitoneal (1—2 ml). După trei săptămîni se sacrifică unul pentru însămînţări şi reacţii serologice, iar al doilea se sacrifică după 6 săptămîni. Se fac însămînţări din splină, ficat şi ganglionii regionali. Se recoltează şi sînge pentru reacţia de aglutinare lentă. Se consideră reacţie pozitivă cînd titrul minim este 1/10 (Linsert şi col., 1970).

Taxonomie: specii de *Brucella* care pot fi considerate „clasice" sînt *Br. melitensis*, *Br. abortus* şi *Br. suis*. Diferiţi sistematicieni, în decursul timpului, au adăugat la acestea şi alte specii, unele rămînînd, altele fiind între timp din nou eliminate din genul *Brucella* sau reconsiderate ca biotipuri. O altă problemă privind clasificarea brucelelor se referă la variabilitatea unor caractere în cadrul aceleiaşi specii. Unele din acestea sînt însuşiri esenţiale, ca de exemplu existenţa unor diferenţe între receptivitatea naturală a animalelor gazdă, altele se referă la numai una sau mai multe proprietăţi biochimice. În acest sens, speciile clasice au fost împărţite în biotipuri, al căror număr a înregistrat de asemenea variaţii de-a lungul timpului în funcţie de părerea diferiţilor autori. Punctul de vedere oficial în momentul de faţă este cel formulat de comitetul mixt F.A.O./O.M.S. de experţi în probleme de bruceloză, după care, în cadrul genului sînt acceptate următoarele specii şi biotipuri: *Br. melitensis* cu 3 biotipuri, *Br. abortus* cu 9 biotipuri, *Br. suis* cu 4 biotipuri, *Br. neotomae*, *Br. ovis* şi *Br. canis*, ultimele 3 avînd un singur biotip (tabelul 12).

TABELUL 12

Caracterele diferenţiale generale între speciile şi biotipurile de Brucella

Specia	Biotipul	Lizat de fagul		Necesitate de CO_2	Producţia de H_2S	Creşterea în prezenţa coloranţilor (a)					Aglutinat de:			Rezervorul obişnuit
						Fucsină		Tionină			Seruri monospecifice (b)		Ser antirugos	
		DTR	$10^4 \times$ DTR			II	III	I	II	III	A	M		
Br. melitensis	1	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	—	Ovine, caprine
	2	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	—	—	Ovine, caprine
	3	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+	—	Ovine, caprine
Br. abortus	1	+	+	±	+	+	+	—	—	—	+	—	—	Bovine
	2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	Bovine
	3	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	—	—	Bovine
	4	+	+	±	+	+	+	—	—	—	—	+	—	Bovine
	5	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—	+	—	Bovine
	6	+	+	—	±	+	+	—	+	+	+	—	—	Bovine
	7	+	+	—	±	+	+	—	+	+	+	+	—	Bovine
	8	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	—	Bovine
	9	+	+	±	+	+	+	—	+	+	—	+	—	Bovine
Br. suis	1	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	Porcine
	2	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	Porcine, iepuri
	3	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	Porcine
	4	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	Ren
Br. neotomae		—	+	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	Şobolan de pădure
Br. ovis		—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	Ovine (berbeci)
Br. canis		—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	Cîini

Legendă: (a) — diferenţierea speciilor este efectuată pe geloză Albimi sau geloză-triptoză cu următoarele concentraţii de coloranţi: 1/25 000 (I), 1/50 000 (II), 1/100 000 (III). Pot fi preferate şi alte concentraţii dacă se întrebuinţează alte medii de cultură. Interpretarea rezultatelor trebuie controlată comparativ cu tulpini de referinţă din fiecare specie;
(b) — A = *abortus;* M = *melitensis*

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

— Testul producţiei de H_2S se execută prin metoda benzilor de hîrtie de filtru cu acetat de plumb (vezi pag. 282) în culturi pe geloză nutritivă, pH 6,6. La fiecare 24 ore, se înlocuiesc benzile. Reacţia se urmăreşte timp de 4—6 zile. Pe fîşiile scoase se măsoară în milimetri înălţimea zonei înnegrite şi se notează ziua cînd hîrtia rămîne albă. La sfîrşit datele se cumulează.

— Determinarea acţiunii bacteriostatice a coloranţilor constă în însămînţarea brucelelor pe medii (geloză-ser-glucozată) care conţin substanţe colorante. Acestea sînt: albastru de bromtimol 0,015%, tionină 1/30 000, pironină 1/100 000, fucsină 1/25 000, violet de genţiana 1/50 000. Pentru tipaj curent experţii O.M.S. şi F.A.O. recomandă tionina şi fucsina bazică. Mediile cu coloranţi se toarnă în plăci Petri, se însămînţează cu ansa dintr-o suspensie groasă de bacterii. După incubare, timp de 3 zile, se citeşte rezultatul. Paralel se însămînţează şi tulpinile standard.

— Determinarea lizosensibilităţii la fagul Tbilisi. Acest fag este activ faţă de tulpinile de *Br. abortus*, are activitate slabă faţă de *Br. suis* şi este inactiv faţă de *Br. melitensis*. Pentru diferenţierea tulpinilor de *Br. abortus* sau de *Br. suis* se folosesc două diluţii de fag 1 DTR şi 10 000 DTR. Din tulpinile de examinat, în faza S, se face o suspensie în ser fiziologic peptonat 1‰ şi se însămînţează cu porttampon de vată muiat în suspensia respectivă. Însămînţarea se face în linii pe suprafaţa unei plăci şi apoi se depune cîte o picătură din diluţiile de fag. Tulpinile de *Br. abortus* sînt lizate de ambele diluţii, în timp ce tulpinile de *Br. suis* sînt lizate numai de dozele de 10 000 D.T.R.

Genul Staphylococcus

Specii: St. aureus (St. pyogenes) şi St. epidermidis

Gazda receptivă şi infecţia naturală: St. aureus este patogen pentru om şi numeroase specii animale la care produce infecţii, în majoritatea cazurilor locale, rareori generale, avînd un caracter predominant piogen. Dintre stafilocociile animale cele mai importante sînt mamita stafilococică (gangrenoasă) a oilor (răsfugul negru) şi mamita stafilococică a vacilor. Printre celelalte infecţii stafilococice, menţionăm dermatitele (mai frecvente la carnasiere), abcesele cu foarte variate localizări, după cum şi inflamaţii purulente ale diferitor organe, pe care le provoacă singur sau în asociaţie cu alte bacterii. La om, *St. aureus* produce furunculoza, infecţii puerperale, diferite infecţii locale şi este frecvent agentul unor toxiinfecţii alimentare. *St. epidermidis* este nepatogen.

Surse de izolare: puroi, lapte, organele cadavrelor prezentate la autopsie, conţinut intestinal, urină, alimente, tegumentul omului şi animalelor sănătoase, aer.

Examen microscopic direct: în frotiurile din puroi, colorate prin metoda Gram, se pot observa germeni sub formă de grupări stafilo, constituite de regulă dintr-un număr mic de coci. Un aspect asemănător se poate găsi în frotiurile din unele alimente care au provocat toxiinfecţii alimentare la om.

Condiţii de cultivare: facultativ aerob-anaerob, se dezvoltă pe medii uzuale (bulion, agar) în 24 ore la 37°C.

Conduita de izolare: din materiale în care stafilococii se găsesc în amestec cu alte bacterii, se recomandă însămînţarea pe medii selective care permit dezvoltarea stafilococilor inhibînd alţi germeni (mediile Chapman, Vogel-

Johnson, Baird-Parker, vezi pag. 241). Mediile selective permit uneori, pe baza aspectelor culturale sau a reacţiilor de culoare, aprecierea unor proprietăţi biochimice sau de patogenitate ale tulpinilor izolate (mediul Chapman-fermentarea manitolului, mediul Vogel-Johnson-activitatea coagulazică). Ca medii selective se mai pot folosi agarul hiperclorurat 7,5% simplu sau cu adaos de sînge de oaie.

Identificare

Morfologie: formă sferică avînd diametrul în jur de 1 micron; în frotiuri, germenii sînt grupaţi sub formă de grămezi, avînd aspectul unor ciorchini de strugure (grupările sînt mai mari şi mai caracteristice în frotiurile din culturile pe medii solide şi mai mici în frotiurile din medii lichide sau din materiale patologice); necapsulat, neciliat, nesporulat, Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate intensă, depozit necaracteristic, uşor omogenizabil, unele tulpini formează un slab inel la suprafaţă; agar — colonii rotunde, neuniforme, în general mari, avînd diametrul între 1 şi 6 mm, opace cu suprafaţa netedă şi lucioasă cu marginile regulate, pigmentate.

Pigmentul: este nedifuzibil în mediu şi de natură lipocromă; culoarea pigmentului se corelează într-o oarecare măsură cu originea tulpinilor şi patogenitatea acestora; astfel, tulpinile patogene de origine umană prezintă un pigment auriu, tulpinile de origine ovină au o culoare albă-cenuşie, cele nepatogene au un pigment alb-cretaceu sau galben-citrin.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, lactoza, zaharoza, manitolul şi glicerolul. Nu fermentează rafinoza, salicina şi inulina; de regulă, hidrolizează hipuratul de sodiu; nu hidrolizează amidonul şi esculina; reduce nitraţii; produce catalază; *St. aureus* este hemolitic.

Proprietăţi antigenice: s-a încercat folosirea reacţiilor de seroaglutinare şi seroprecipitare în vederea diferenţierii stafilococilor patogeni de cei nepatogeni. Julllianele şi Wieghard, 1935, identifică la stafilococii patogeni pe care îi încadrează în grupul antigenic A, un polizaharid antigenic, spre deosebire de grupul antigenic B care cuprinde stafilococii nepatogeni. Numărul serotipurilor a crescut între timp considerabil fiind astăzi peste 40, iar tipizarea serologică nu şi-a găsit aplicaţii în practică.

Lizotipie: setul internaţional folosit în bacteriologia umană a fost adoptat şi pentru stafilococii de origine animală. La aceştia, se adaugă unii fagi specifici pentru stafilococii bovini propuşi de Davidson, 1965.

Rezistenţa: în comparaţie cu alţi coci, stafilococii sînt cei mai rezistenţi la acţiunea factorilor de mediu. Majoritatea celulelor bacteriene se distrug la 60°C în 30 minute, dar celulele izolate sînt distruse în acelaşi interval de timp abia la 80°C. Şi faţă de substanţele chimice, stafilococii sînt mai rezistenţi decît alte bacterii nesporulate În puroiul uscat, germenii supravieţuiesc cîteva luni. Dintre antibiotice, stafilococii sînt sensibili faţă de penicilină (dau însă deseori mutante penicilino-rezistente), tetraciclină, eritromicină, cloramfenicol, neomicină, streptomicină etc.

Patogenitate pentru animale de laborator: cel mai sensibil este iepurele, care în urma inoculării intravenoase face o infecţie care evoluează mortal cu leziuni şi prezenţa unui număr mare de germeni în rinichi. Şoarecele şi cobaiul prezintă un anumit grad de rezistenţă. Şobolanii tineri fac deseori infecţii mortale caracterizate printr-o simptomatologie nervoasă în urma inoculării intravenoase (Bica Popii V. 1958). Tulpinile de origine ovină sînt patogene în condiţii experimentale şi pentru hamster, porumbel (Stamatin şi col., 1957) şi prepeliţa japoneză (Marica, 1971).

Mecanismele patogenității stafilococilor: patogenitatea stafilococilor se datorește virulenței și unui bogat arsenal de secreții determinante pentru agresivitatea sau toxicitatea tulpinilor. Principalele secreții responsabile de patogenitatea stafilococilor și metodele aplicate pentru punerea lor în evidență sînt următoarele:

1) *Stafilocoagulaza* acționează *in vivo* și *in vitro* prin coagularea plasmei. Prezența ei se pune în evidență prin testul coagulazei descris la pag. 293. Cînd există un interes deosebit testul coagulazei se poate executa și cantitativ (volume egale de plasmă sînt amestecate cu cantități descrescînde din cultura în bulion de 24 ore a tulpinii de examinat). Activitatea coagulazică este evidențiabilă și prin cultivarea pe mediile Baird-Parker și Vogel-Johnson (vezi pag. 241).

2) *Hemolizinele* acționează prin liza globulelor roșii și se examinează prin cultivare pe agar cu sînge. La *St. aureus* se pot deosebi 4 tipuri de hemolizine cu însușiri fizico-chimice și activitate biologică diferită:

— hemolizina α, caracteristică în general pentru tulpinile de origine umană, este activă față de hematiile de iepure și produce pe agar-sînge o zonă de hemoliză clară cu marginile neprecis delimitate; hemolizina α acționează la 37°C și nu-și prelungește efectul la 4°C. Hemolizinei se atribuie efecte dermo-necrotice, letale și leucocidinice;

— hemolizina β este prezentă într-o mai mare măsură la tulpinile de origine animală, are o activitate mai pronunțată față de hematiile de oaie și bou, pe agar-sînge produce o zonă întinsă de hemoliză, mai puțin clară decît în cazul hemolizinei α, dar cu margini net delimitate. În cazul trecerii culturilor de la 37°C la 4°C hematiile se lizează total, mediul devenind transparent. Hemolizina β nu are efect letal decît în doze mari. În comparație cu celelalte hemolizine stafilococice, hemolizina β are un grad de termorezistență mai ridicat. Hemolizina β inhibă ac-

tivitatea hemolizinei α. Activitatea lizinei δ este în schimb accentuată în zona hemolizei β;

— hemolizina γ este activă faţă de hematiile mai multor specii (iepure, oaie) şi inactivă pentru hematiile de cal. Temperaturile ridicate influenţează defavorabil hemolizina γ, care este foarte labilă. La temperaturi joase activitatea acestei fracţiuni este în schimb de lungă durată;

— hemolizina δ este antigenic distinctă de celelalte fracţiuni, iar elaborarea ei este condiţionată de cultivarea germenilor într-o atmosferă îmbogăţită în CO_2.

3) *Hialuronidaza* sau factorul de difuziune este o enzimă cu activitate litică pentru acidul hialuronic, care favorizează dispersarea germenilor în ţesuturi bogate în această substanţă. Ea poate fi pusă în evidenţă prin inoculare intradermică la iepure în asociaţie cu o substanţă colorantă (de ex., albastrul de metilen). Concluziile privind prezenţa şi cantitatea de hialuronidază sînt deduse pe baza mărimii zonei din jurul locului de inoculare în care difuzează colorantul.

4) *Necrodermotoxina*, socotită multă vreme ca o secreţie aparte, este identificată în ultimii ani cu hemolizina α

5) *Toxina cu efect letal* este o secreţie a cărei prezenţă se deduce pe baza morţii la cîteva minute de la inocularea intravenoasă a iepurilor, cu filtrate de culturi. Se presupune că această fracţiune acţionează asupra miocardului şi după unii autori, asupra celulei nervoase.

6) *Leucocidinele* determină distrugerea leucocitelor. Au fost descrise trei tipuri de leucocidine (leucocidina NW — Neisser-Wechsberg, leucocidina PV — Panton-Valentine şi leucolizina), care pot fi considerate şi ca fracţiuni ale aceluiaşi principiu activ.

7) *Fibrinolizina* este o secreţie prezentă mai frecvent la stafilococii de origine umană şi canină. Această secreţie acţionează prin liza fibrinei. Nu este suficient de bine sta-

bilit rolul ei în infecţia stafilococică, iar în practica de laborator curentă nu se recurge la punerea ei în evidenţă.

8) *Enterotoxina* este o secreţie termostabilă elaborată de unele tulpini de stafilococ. Prezenţa acestei toxine este responsabilă de tulburările digestive pe care le provoacă tulpinile capabile să producă toxiinfecţii alimentare. Punerea în evidenţă a enterotoxinei se realizează prin inoculare intraperitoneală la pisoi (testul Dolman) a filtratelor obţinute din culturi în medii speciale incubate în atmosferă de CO_2. M a r i c a (1971) a stabilit că nu există o corelaţie prea strînsă între secreţia de coagulază şi enterotoxină, numeroase tulpini coagulazo-negative fiind capabile să elaboreze enterotoxina.

În afară de secreţiile enumerate, stafilococii patogeni elaborează o A.D.N.-ază, o fosfatază, o arginază şi alte enzime, intervenţia unora dintre ele în mecanismul patogenităţii confirmîndu-se în lucrări de dată mai recentă.

Taxonomie: există un acord unanim privind încadrarea stafilococilor în două specii: *St. aureus* şi *St. epidermidis*. *St. aureus* include tulpinile patogene, iar *St. epidermidis* tulpinile nepatogene. Pentru aprecierea patogenităţii unei tulpini şi deci pentru stabilirea apartenenţei ei la o specie sau alta se iau în considerare în primul rînd răspunsurile pozitive la un număr cît mai mare din testele de punere în evidenţă a mecanismelor de patogenitate enumerate mai sus. La acestea se pot adăuga şi o serie de teste ajutătoare cum sînt: fermentarea manitolului, gelatinoliza, culoarea pigmentului, aspectul cultural pe medii cu cristal violet, dezvoltarea pe medii cu sublimat etc. Încadrarea tuturor tulpinilor într-o specie sau alta implică uneori numeroase dificultăţi datorită răspunsurilor discordante la diversele teste de patogenitate.

O a doua problemă de taxonomie asupra căreia nu există însă un punct de vedere unitar, literatura cuprinzînd mai multe propuneri, se referă la tipuri. Dintre propu-

nerile existente în acest sens menţionăm pe cea a lui Stamatin şi col. (1949—1957) şi pe cea a lui Meyer (1967).

Stamatin şi col. propun două tipuri (uman şi ovin), care se diferenţiază între ele pe baza criteriilor redate în tabelul 13.

TABELUL 13

Deosebirile între tipurile uman şi cel ovin ale speciei St. aureus (după Stamatin şi col., 1949—1957)

Criteriul de diferenţiere		Tipul uman	Tipul ovin
Pigmentul		auriu	alb-gris
Activitatea coagulazică faţă de:	Plasma de iepure	+	+
	Plasma de bou	—	+
Tipul de hemolizine		α	α şi β
Patogenitatea experimentală pentru:	Hamster	—	+
	Porumbel	—	+

Marica (1971) constată că porumbelul poate fi înlocuit cu bune rezultate în examenul patogenităţii stafilococilor cu prepeliţa japoneză.

Meyer (1967) propune trei tipuri: uman, bovin şi canin, criteriile de diferenţiere dintre ele fiind redate în tabelul 14. În afară de activitatea coagulazică, Meyer ia în considerare pentru propunerea sa şi activitatea hemolitică, sensibilitatea faţă de bacteriofagi şi aspectul cultural pe agarul cu cristal violet.

TABELUL 14

Deosebirile între tipurile uman, bovin și canin ale speciei St. aureus (după M e y e r, 1967)

Criteriul de diferențiere		Tipul uman	Tipul bovin	Tipul canin
Activitatea coagulazică față de plasma de:	om	+	+	—
	bou	—	+	+

Genurile Micrococcus, Gaffkya și Sarcina

Aceste genuri, încadrate tot în familia *Micrococcaceae*, cuprind germeni nepatogeni, dar care prin asemănările morfologice și culturale, pe care le prezintă cu stafilococii pot crea confuzii în identificarea acestora. Baze teoretice solide privind deosebirile între aceste bacterii au fost stabilite prin schema propusă de B a i r d P a r c k e r, 1965, care are drept criteriu esențial de diferențiere, deosebirile din structura ADN și în special raportul cantitativ ponderal diferit dintre guanină și citozină (GC%). Cum asemenea criterii nu sînt însă la îndemîna bacteriologului practician, recomandarea lui M e r c h a n t și P a c k e r, 1967, de a lua în considerare absența totală a activității hemolitice la aceste bacterii, în vederea eliminării posibilităților de confuzie cu stafilococii patogeni, este cît se poate de rezonabilă.

FAMILIA LACTOBACILLACEAE

Genul Streptococcus

Gazde receptive și infecții naturale: genul *Streptococcus* cuprinde un număr important de specii care produc di-

verse infecţii la un număr mare de specii animale. Infecţiile streptococice, care ocupă un loc mai important în patologia veterinară sînt: mamita streptococică a vacilor, gurma la tineretul cabalin, infecţiile septicemice cu evoluţie enzootică întîlnite la tineret în cadrul diferitelor speci animale (purcei, miei), streptococii enzootice la păsări şi la şoarecii albi de laborator. Streptococii mai produc, singuri sau în asociaţie cu alte specii bacteriene, infecţii locale diverse. Astfel, de la cabaline se izolează streptococi din artrite în cazuri de piosepticemie a mînjilor, fistula grebănului, gangrena gazoasă; de la cîine şi pisică, din diverse dermatite, otite, faringite etc. La om, streptococii produc scarlatina, erizipelul, tonsilite, infecţii puerperale. În nefrite, stări reumatismale, gangrenă gazoasă etc., streptococii au deseori la om un rol etiologic însemnat. Enterococii pot fi uneori agenţi ai toxiinfecţiilor alimentare la om.

Surse de izolare: taurine: lapte, puroi, secreţii vaginale. Cabaline: puroi, lichid sinovial. Diverse specii: lapte, puroi, organe diferite (cord, rinichi, pulmon, articulaţii, splină, ficat etc.), suprafaţa mucoaselor căilor digestive anterioare.

Examenul microscopic direct: în majoritatea cazurilor germenii sînt evidenţiabili în frotiurile executate din laptele recoltat din mamite (ca atare sau depozit de centrifugare), din puroi în cazuri de gurmă,din diverse organe cu leziuni etc.

Condiţii de cultivare şi izolare: există specii aerobe şi anaerobe; majoritatea streptococilor sînt serofili şi se dezvoltă bine în bulion şi pe agar cu ser. Pentru izolare, se recomandă agarul cu sînge. Unele specii sînt halofile şi cresc pe medii cu sînge şi NaCl 7%. Pentru speciile anaerobe se recomandă mediul Kitt-Tarozzi sau bulionul VF cu ser. Pentru izolarea enterococilor agarul cu cristal violet şi azid de sodiu (vezi pag. 240) şi mediul Frazier (vezi

pag. 286). Pentru izolarea streptococilor din mamite sînt adecvate medii selective cu esculină, sînge defibrinat de bou şi cristal violet (vezi pag. 241). În cazurile cînd încercările de izolare din lapte sînt neconcludente, se recomandă însămînţări din depozitul de centrifugare. Temperatura optimă de cultivare este 37°C. Majoritatea speciilor se dezvoltă în 24 ore. Viabilitatea germenilor în culturi este în medie de 30 zile.

Identificare

Morfologie: germen de formă sferică sau ovală cu diametrul de aproximativ 1 micron, grupat în lanţuri. Lungimea lanţurilor este în funcţie de specie, tulpină şi materialul din care se execută frotiurile. Astfel, *Str. equi* formează lanţuri lungi, în timp ce streptococii din mamite, lanţuri, mijlocii sau scurte. În frotiurile din culturile în medii lichide, lanţurile sînt totdeauna mai lungi în comparaţie cu cele de pe medii solide sau din organe. Unii streptococi sînt capsulaţi, dar majoritatea nu prezintă această particularitate morfologică. Este neciliat, nesporulat, Gram pozitiv.

Caractere culturale: gradul de turbiditate al mediilor lichide este în funcţie de lungimea lanţurilor. Tulpinile care formează lanţuri lungi se dezvoltă aglutinat, în timp ce mediul de cultură rămîne limpede. Streptococii constituiţi din lanţuri scurte produc o turbiditate de intensitate variabilă a culturilor. Pe mediile solide, streptococii formează colonii rotunde, de dimensiuni constant mici (aproximativ 1 mm diametru), transparente sau semitransparente nepigmentate.

Proprietăţi biochimice: există variaţii în funcţie de specii, care se diferenţiază, printre alte criterii, pe baza activităţii enzimatice faţă de glucide şi polialcooli, după cum şi a proprietăţilor hemolitice. La streptococi, se deosebesc trei tipuri de comportare faţă de hematiile de cal:

— tipul α sau efectul viridans, care constă în modificarea culorii agarului cu sînge, din roşu, într-o culoare de nuanţă verzuie; această modificare nu se datoreşte de fapt lizei globulelor roşii, ci transformării hemoglobinei în methemoglobină;

— tipul β sau hemoliza adevărată însoţită de hemodigestie în care mediul se decolorează şi devine total transparent;

— tipul γ cuprinde tulpinile nehemolitice.

Alte teste biochimice care pot fi utilizate pentru diferenţierea speciilor de streptococi sînt comportarea în laptele turnesolat şi descompunerea hipuratului de sodiu (tabelul 16).

Structura antigenică: o clasificare serologică universal acceptată a streptococilor, cu aplicaţii practice în identificarea speciilor, a fost realizată prin cercetările întreprinse în perioada 1928—1946 de L a n c e f i e l d. Împărţirea streptococilor în grupe serologice s-a făcut, pe baza unui antigen de natură glucidică cu specificitate de grup denumit „substanţa C". Pentru determinarea grupei serologice se foloseşte reacţia de seroprecipitare, antigenii fiind pregătiţi prin hidroliză cu HCl la cald, a suspensiilor culturilor din tulpinile de tipizat.

Rezistenţă: streptococii sînt foarte sensibili la acţiunea factorilor de mediu. La 60°C sînt distruşi în intervale care diferă de la o specie la alta. Streptococii de origine animală sînt mai rezistenţi. Uneori, streptococii din grupa mamitelor nu sînt distruşi în totalitate prin operaţiile de pasteurizare a laptelui. Aceiaşi streptococi au fost izolaţi şi din probe de lapte praf. Streptococii sînt sensibili la uscăciune. Rezistă în general mai bine cînd sînt incluşi în material organic (de ex., *Str. equi* în puroiul din leziunile de gurmă). Dezinfectantele sînt active în concentraţiile uzuale. La fel şi numeroase antibiotice printre care în pri-

TABELUL 15

Caractere diferențiale între grupele de streptococi

Grupa	Specii importante	Criteriul de diferențiere							
		Sursa de izolare	Patogenitate	Tip de hemoliză	Dezvoltare în următoarele condiții:				
					10°C	45°C	pH 9,6	în prez. NaCl 6,5%	în lapte cu 0,1% albastru de metilen
Piogenică	*Str. pyogenes, Str. agalactiae, Str. dysgalactiae, Str. equi, Str. zooepidemicus, Str. equisimilis*	Materiale patologice; de pe mucoase de la om și animale	Patogene pentru animale sau om	β la majoritatea speciilor	—	—	—	—	—
Viridans	*Str. salivarius, Str. bovis, Str. equinus, Str. uberis, Str. mitis*	„	Produc uneori infecții (de obicei cronice)	α	±	±			
Enterococi	*Str. faecalis, Str. faecium, Str. durans*	Din fecale de la om și animale	Produc uneori toxiinfecții alimentare la om	γ sau β			+	+	+
Lactică	*Str. lactis, Str. cremoris*	Din lapte		γ	+	—	—	—	

mul rînd penicilina (streptococii nu dau mutante penicilino-rezistente).

Patogenitate: în cadrul genului există numeroase specii nepatogene. Speciile patogene pentru animale și om își datoresc patogenitatea virulenței și diferitelor secreții toxice, printre care menționăm hemolizinele streptococice (streptolizinele), hialuronidaza, leucocidinele, o coagulază (la unele specii) etc. Dintre animalele de laborator, cel mai sensibil este șoarecele, calea de inoculare cea mai severă fiind cea intraperitoneală.

Taxonomie: streptococii au fost încadrați în 4 grupe (piogenică, viridans, a enterococilor și lactică), care se diferențiază între ele pe baza nișei ecologice, a patogenității, a tipului de hemoliză, a sensibilității față de anumiți factori de mediu etc. (tabelul 15).

În cadrul grupelor, speciile se diferențiază pe baza următoarelor criterii: tipul de hemoliză, activitatea enzimatică față de glucide și polialcooli, hidroliza hipuratului de sodiu, comportarea în lapte turnesolat, grupa serologică Lancefield (tabelul 16).

Examenul produselor alimentare din punct de vedere al prezenței enterococilor: o problemă care interesează bacteriologia alimentelor o constituie evidențierea în anumite produse alimentare a prezenței enterococilor, ca indicator igienico-sanitar. În acest scop, se recurge la însămînțări pe mediul cu azid de sodiu și cristal violet sau pe mediul Frasier. Identificarea enterococilor din punct de vedere al speciei, de regulă, nu prezintă interes practic.

Conduita diagnosticului în mamita streptococică: pentru examenul probelor de lapte din punct de vedere al conținutului în agenți ai mamitei streptococice se recomandă examenul microscopic direct, însămînțări în bulion cu ser, pe agar-sînge și pe agar cu esculină, sînge defibrinat de bou și cristal violet (vezi pag. 241); paralel se recurge la executarea testului cu brom-crezol purpur și a testului CAMP

TABELUL 16

Caractere diferențiale între streptococii patogeni pentru animale
(după Merchant și Packer, 1967, modificat)

Specia	Gazda receptivă	Infecția produsă	Caractere diferențiale											
			Tipul de hemoliză	Activitate fermentativă față de:							Comportarea în lapte turnesolat			Grupul Lancefield
				Salicină	Manitol	Lactoză	Rafinoză	Trehaloză	Sorbitol	Hipurat de sodiu	Acidifiere	Coagulare	Reducere	
Str. pyogenes	Om	Scarlatină, erizipel, tonsilite, septicemii etc.	β	+	±	+	—	+	—	—	+	—	±	A
Str. zooepidemicus	Numeroase specii animale	Infecții generale enzootice la păsări, purcei, miei, șoareci albi, infecții locale diverse	β	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	C
Str. equi	Cal	Gurma	β	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C
Str. equisimilis	Om și diverse specii animale	Diverse infecții locale	β	+	—	±	—	+	—	—	+	—	±	C
Str. agalactiae	Taurine	Mamită streptococică	γ, α rareori slab β	+	—	+	—	+	—	+	+	+	±	B
Str. dysgalactiae				—	—	+	—	+	—	—	+	—	+	C
Str. uberis				+	+	+	—	+	+	+	+	±	++	
Str. canis	Cîine	Infecții locale	β	+	—	+	—	—	—	—	+	—	+	C

(vezi pag. 293) direct din lapte. Ulterior, testul CAMP se poate relua pornind de la culturile de streptococ izolate. Pentru diferenţierea speciilor se recurge la criteriile din tabelul 16. În cazul cînd se urmăreşte un grad de certitudine mai mare, examenele menţionate mai sus se pot executa pornind de la sedimentul de centrifugare al probelor de lapte.

Genul Diplococcus

Specia D. pneumoniae

Numele comun: pneumococ.

Gazda receptivă şi infecţia naturală: produce pneumonii la om şi uneori la animale (viţei, cobai).

Surse de izolare: organe cu leziuni (pulmon).

Examenul microscopic direct: în frotiurile colorate prin metodele Gram şi Giemsa se observă diplococi capsulaţi.

Condiţii de cultivare: aerob, pe medii cu ser sau sînge, incubare timp de 24—48 ore la 37°C.

Identificare

Morfologie: coc, avînd dimensiunile între 0,5—1,25 microni, de formă ovală, asimetrică, cu o extremitate mai rotunjită şi una mai ascuţită (formă lanceolată), dispus în grupări diplo cu extremităţile mai ascuţite faţă în faţă; caspulat — capsula este comună pentru o grupare diplo, este de natură polizaharidică, este evidenţiabilă în frotiuri din organe, este absentă în culturi. Germen neciliat, nesporulat, Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate moderată; medii solide — colonii constant mici, rotunde, cu diametrul de 1 mm, albe-cenuşii, semitransparente, nepigmentate.

Proprietăţi biochimice: fermentează constant glucoza, lactoza, maltoza, zaharoza, esculina şi inulina, deseori şi rafinoza şi salicina; în majoritatea cazurilor, nu fermentează manitolul; nu produce indol, nu reduce nitraţii; este neproteolitic; acidifică şi coagulează laptele. O proprietate biochimică caracteristică pentru această specie este sensibilitatea faţă de bilă, care în concentraţii de 1/10 lizează celulele bacteriene (testul de biloliză).

Structură antigenică: îndeosebi pe baza antigenilor capsulari, pornindu-se de la 4 tipuri antigenice clasice, s-a ajuns astăzi la diferenţierea a peste 70 serotipuri.

Patogenitate: principalul mecanism al patogenităţii pneumococului este virulenţa (capsula are un important rol antifagocitar). Dintre animalele de laborator, cel mai sensibil este şoarecele, care pe cale intraperitoneală face o infecţie mortală, iar la autopsie în frotiurile din organe (pulmon, lichid peritoneal), se găsesc numeroşi germeni capsulaţi.

Specia D. pluton

Este o specie neomologată oficial. Se observă în frotiurile din larvele albinelor cu locă europeană. Se presupune a fi singurul sau unul din asociaţii complexului etiologic bacterian care produc această infecţie.

Genul Lactobacillus

Cuprinde numeroase specii nepatogene care se găsesc în lapte, diverse produse alimentare, dar pot fi izolate şi din salivă, din fecale şi din diverse organe de la om şi animale.

Din punct de vedere morfologic, germenii din acest gen au formă de bacil, de dimensiuni variabile, necapsulaţi, neciliaţi, nesporulaţi, Gram pozitivi.

Se cultivă pe medii cu pH slab acid şi dau culturi bine dezvoltate în 2—6 zile. Temperatura optimă este 22°C.

Din punct de vedere biochimic, fermentează glucoza, coagulează şi reduc laptele turnesolat.

Diferenţierea între specii se face pe baza aspectelor culturale, a particularităţilor morfologice (mărimea bacililor şi lungimea lanţurilor), a posibilităţii de dezvoltare la diferite temperaturi (15°C, 45°C, şi 48°C) şi a activităţii fermentative faţă de diverse glucide şi polialcooli. În determinatorul Bergey 1957, genul *Lactobacillus* include 15 specii.

FAMILIA CORYNEBACTERIACEAE

Genul Corynebacterium

Specia C. pyogenes (Bacillus pyogenes)

Gazda natural receptivă şi infecţia naturală: patogen pentru animale şi om. Mai frecvent, se izolează de la porcine şi bovine, mai rar de la alte specii (ovine). Infecţia la porcine denumită piobaciloză, se caraoterizează prin abcese cu diverse localizări, poliartrite, spondilite, bronhopneumonii. La bovine, infecţia se manifestă mai frecvent sub formă de artrite, mamite, omfalite, avorturi. Se poate găsi şi ca microb de asociaţie în bronhopneumonii la bovine şi porcine. La alte specii animale (ovine, caprine) produce colecţii purulente, pneumonii, mastite. De la om se izolează din faringite.

Surse de izolare: materialul purulent din abcese, artrite, avortoni, secreţii vaginale, spermă, lapte (la vaci cu mamită).

Examen microscopic direct: în frotiurile din puroi se observă bacili Gram pozitivi, fini, subţiri, uneori coloraţi granular, dispuşi în grupări neregulate.

Condiţii de cultivare: aerob, dar se dezvoltă bine şi în anaerobioză, temperatura optimă 37°C, pH neutru. Cultura evidentă la 48 ore. Se dezvoltă pe medii cu ser sau sînge; condiţii optime sînt asigurate de mediul cu extract cord-creier şi adaos de ser. Viabilitatea în culturi este redusă. Pentru conservare în laborator se poate întreţine în bulion cu ser sau sînge sau în lapte, la temperatura camerei şi cu transplantări lunare. Cea mai bună metodă de conservare a tulpinilor este liofilizarea.

Identificare

Morfologie: bacil mic, de 0,5—2 microni lungime şi 0,2—0,3 microni grosime, subţire, cu capetele ascuţite, grupări neregulate (aspect de litere chinezeşti) şi în palisadă. Este nesporulat, neciliat, necapsulat, Gram pozitiv, în culturi vechi însă se decolorează uşor.

Caractere culturale: medii lichide — în bulion cu ser formează un depozit fin, granular pe fund şi pe pereţii tubului; nu formează peliculă; medii solide — pe agar cu ser — colonii mici, fine, transparente, asemănătoare cu cele de streptococ. Examinate la lupă însă sînt mai bombate şi mai strălucitoare, în timp ce coloniile de streptococ sînt mai plate şi mai mate.

Proprietăţi biochimice: fermentează (în bulion cu ser) glucoza, zaharoza, lactoza şi xiloza, nu fermentează rafinoza, inulina, manitolul şi salicina. Lichefiază gelatina, coagulează laptele după 48 ore la 37°C, îl acidifică şi ulterior îl peptonizează. Este beta hemolitic, nu produce indol, nu produce H_2S, nu reduce nitraţii, reacţiile roşului metil şi Voges Proskauer sînt negative.

Rezistenţa: este sensibil la acţiunea factorilor fizici şi chimici. Dintre antibiotice este foarte sensibil *in vitro* faţă de penicilină; totuşi tratamentul nu dă rezultate corespunzătoare datorită caracterului leziunii.

Proprietăţi antigenice: este omogen din punct de vedere antigenic.

Patogenitatea: se datoreşte virulenţei şi toxicităţii. S-a pus în evidenţă o exotoxină hemolitică. În condiţii experimentale produce infecţii mortale prin inoculare intravenoasă la iepure şi şoarece. Este nepatogen pentru cobai, şobolan.

Alte specii din genul Corynebacterium: dintre speciile patogene pentru om cea mai importantă este *C. diphteriae* — agentul difteriei la om.

La animale, se mai întîlnesc în afara infecţiilor cu *C. pyogenes* şi infecţii produse de *C. pseudotuberculosis*, *C. equi*, *C. renale*, *C. kutscheri* (*C. murium*), iar în ultimul timp se semnalează tot mai frecvent şi prezenţa unei specii nepatogene *C. bovis*.

TABELUL 17

Speciile din genul Corynebacterium patogene pentru animale şi infecţiile naturale pe care le provoacă

Specia bacteriană	Gazda receptivă	Infecţia naturală
C. pyogenes	porcine, bovine, ovine, caprine, rar alte specii	— piobaciloza; — infecţii purulente localizate, cu caracter sporadic
C. pseudotuberculosis (*C. ovis*)	ovine, cabaline	— limfadenită cazeoasă (pseudotuberculoza); — limfangită ulceroasă
C. equi	cabaline	— bronhopneumonie enzootică mînji
C. renale	bovine	— pielonefrită
C. kutscheri (*C. murium*)	şoarece	— pseudotuberculoză
C. bovis	bovine	— nepatogen, se izolează din lapte

Speciile cuprinse în tabelul 17, se pot deosebi pe baza caracterelor morfologice, condițiilor de cultivare și caracterelor culturale și a proprietăților biochimice (tabelele 18 și 19).

TABELUL 18

Caracterele diferențiale morfologice și culturale ale speciilor de corynebacterii izolate de la animale

Specia	Morfologie	Caractere culturale	
		medii lichide	medii solide
C. pyogenes	bacili fini, 0,3—2 microni/ 0,2 microni	limpede, depozit fin, granular	colonii mici, fine, transparente
C. pseudotuberculosis [*C. ovis*]	bacili fini sau cocoizi, 1—3 microni/0,5—0,6 microni	limpede, depozit fin, granular, peliculă	mici, crem-oranj-lobate, compacte, uscate
C. equi	bacili mai mari și mai groși în medii lichide, cocoid pe medii solide	tulbure, fără peliculă și cu sediment sau cu peliculă	colonii mari, lucioase, mucoase difluente, galbene-crem
C. renale	bacilar 2—3 microni/0,7 microni, uneori cocoid	sediment, mediul limpede	colonii mici, opace, uscate, albe-cenușii sau lucioase, pigmentate crem
C. bovis	bacilar 2,5—3 microni/0,5—0,7 microni	turbiditate slabă, depozit granular	colonii rotunde, cenușii, radiare, ondulate, uscate
C. hutscheri	bacil cu capete ascuțite	ușoară turbiditate	colonii mici, fine, transparente

TABELUL 19

Caracterele diferenţiale biochimice ale speciilor de corynebacterii izolate de la animale

	Hemoliza	Lapte turnesolat	Lichefierea serului coagulat	Ureaza	Reducerea nitraţilor	Catalaza
C. pyogenes	+	ACP	+	—	—	—
C. equi	±	—	—	—	+	+
C. pseudotuberculosis (*C. ovis*)	±	—	—	+	—	+
C. renale	—	Alc	—	—	—	—
C. kutscheri	—	—	—	+	—	
C. bovis	—	—	—	—	—	—

Legendă: +=pozitiv; —=negativ; ±=de regulă pozitiv; *Alc*=alcalinizare; *A*=acidifiere; *C*=coagulare; *P*=peptonizare.

Pe lîngă testele menţionate în tabelul 19, speciile de *Corynebacterium* mai pot fi diferenţiate şi pe baza fermentării zaharurilor, dar rezultatele nu sînt totdeauna concludente. Speciile *C. equi* şi *C. bovis* sînt în general inactive faţă de glucide şi polialcooli.

Infecţia experimentală, pe animale de laborator, poate fi reprodusă cu unele din speciile care se izolează de la animale, aşa cum reiese din tabelul 20.

Genul Erysipelothrix

Specia E. insidiosa (E. rhusiopathiae)

Numele comun: bacilul rujetului

Gazda receptivă şi infecţia naturală: infecţia produsă de *E. insidiosa,* denumită rujet sau popular brînică, se în-

TABELUL 20

Infecţia experimentală pe animale de laborator cu speciile zoopatogene de Corynebacterium

	Iepure	Cobai	Şoarece
C. pyogenes	i.v. infecţie mortală, artrite	rezistent	i.v. infecţie mortală i. perit
C. equi	p r a c t i c	n e p a t o g e n	
C. pseudotuberculosis	i.p. pseudotuberculoză miliară cu moarte rapidă	sc. - abces i.p.- orhivaginalită (fenomen Strauss) mortal 7—8 zile	—
C. renale	—	—	doze mari
C. kutscheri	—	—	infecţie mortală
C. bovis	0	0	0

tîlneşte la porcine, mai rar la alte specii (ovine — artrite la miei), diferite specii de păsări (mai frecvent la curcani şi păsări de baltă), om — erizipeloidul lui Rosenbach (infecţie cutanată).

Surse de izolare: organele animalelor infectate, amigdale de la purtători.

Examen microscopic direct: în frotiuri din organe bacili fini, subţiri, drepţi sau uşor încurbaţi, Gram pozitivi, deseori fagocitaţi.

Condiţii de cultivare: aerob-anaerob facultativ; temperatura optimă 37°C, pH 7,4—7,8. Se dezvoltă pe medii uzuale dar mai abundent pe medii cu ser, sau în prezenţa triptofanului. Dacă materialul din care se face însămînţarea este contaminat se folosesc medii selective: mediul cu

azid de sodiu şi cristal violet sau mediul cu sînge, la care se adaugă neomicina 100 micrograme/1 ml sau kanamicina 400 micrograme/1 ml. În culturi, are o rezistenţă deosebită; rezistă cîteva luni la temperatura camerei, iar cultura în bulion mai mulţi ani (11 ani, după Isopescu, cit. Stamatin, 1965).

Identificare

Morfologie: în frotiuri din culturi se pot observa forme bacilare mai lungi sau mai scurte avînd 0,5—2,5 microni lungime/0,2—0,4 microni grosime, uneori filamentoase. Este nesporulat, necapsulat, neciliat, Gram pozitiv; în culturi vechi se decolorează relativ uşor; de aceea poate fi considerat Gram labil.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate slabă, uniformă, la agitarea culturilor tinere se formează valuri cu aspect de fum de ţigară; în culturi vechi, se constituie un depozit mic, lenticular, aderent, care la agitare se ridică sub forma unui filament răsucit; medii solide — colonii mici, fine, transparente, suprafaţa mediului avînd aspectul unui geam aburit. Pe medii de cultură, disociază în variante R caracterizate prin colonii mai mari, neregulate, cu suprafaţă mată, constituite din forme predominant filamentoase.

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, galactoza, fructoza şi lactoza, inconstant xiloza, arabinoza, manoza, maltoza, celobioza şi melibioza; în general nu fermentează glicerolul, sorbitolul, manitolul, inozitolul, ramnoza, zaharoza, trehaloza, rafinoza, amidonul, inulina, salicina (pentru proba fermentării se recomandă adăugarea la mediu de cultură a autolizatului de drojdie — Bergey, 1957). Nu produce indol, nu modifică laptele turnesolat, produce H_2S, nu hidrolizează esculina; pe medii cu sînge după o incubaţie prelungită apare o zonă de hemoliză alfa

(*viridans*); nu reduce nitraţii; proba catalazei, a roşului metil şi Voges Proskauer sînt negative.

Proprietăţi antigenice: prin reacţia de seroprecipitare s-au identificant mai multe tipuri serologice notate A, B, N. S-a constatat că există unele relaţii între tipul serologic al unei tulpini şi valoarea sa imunizantă, după cum şi între tipul serologic şi tipul fagic; fagii rujetici sînt activi faţă de tulpinile de tip A şi inactivi faţă de tipul B.

Rezistenţă: este un germen sensibil la acţiunea factorilor fizici şi chimici. La 70°C se distruge în 5—10 minute; este sensibil faţă de dezinfectante: biclorura de mercur 1/100, formolul 2% şi fenolul 5% omoară microbul în 5—15 minute. Dintre antibiotice, sînt active: penicilina 0,2—0,9 U.I./ml, streptomicina 20—70 gamma/ml, aureomicina 5—10 gamma/ml, cloramfenicolul 15—20 gamma/ml, hostaciclina 10 gamma/ml (Ungureanu, citat Stamatin, 1965). Sulfamidele sînt inactive *in vivo* (*Merchant şi Packer*, 1957).

Patogenitatea se datoreşte virulenţei. În condiţii experimentale este patogen pentru animale de laborator; în ordinea sensibilităţii sînt receptivi şoarecele şi porumbelul pe diverse căi, infecţiile mortale avînd durata de 4—5 zile; mai puţin sensibil este iepurele (infecţia mortală se produce numai cu doze mari pe cale intravenoasă); cobaiul este rezistent.

Genul Listeria

Specia L. monocytogenes

Gazda receptivă şi infecţia naturală: L. monocytogenes produce listerioza la diferite specii animale şi om caracterizată prin: la ovine — tulburări nervoase (pareze, para-

lizii) însoţite de modificări ale formulei sanguine (monocitoză, neutrofilie) şi avorturi; la bovine — avorturi; la porcine — infecţii sporadice, rar enzootice (mai frecvente la purceii sub 3 luni) sub formă de septicemii, encefalite (manifestate prin pareze, hemiplegii, stări de agitaţie); la cabaline — febră, astenie, tulburări nervoase; la iepuri — enterită, uneori tulburări nervoase; la păsări (în special bobocii de gîscă de 2—3 săptămîni) — tulburări digestive, tulburări nervoase; la peşti — infecţii mortale (la păstrăvi). La om, infecţia denumită şi febra glandulară sau mononucleară poate evolua sub diferite forme: angino-septicemică cu mononucleoză, oculo-granulomatoasă, septico-tifică, meningo-encefalitică, septico-granulomatoasă, listerioză de graviditate.

După Murray (citat Merchant şi Packer, 1963) *L. monocytogenes* s-a izolat de la 18 specii de animale. În ţara noastră listerioza a fost diagnosticată de Volintir în 1951 şi studii mai ample au fost realizate de Darie (1968) şi Roşca (1970).

Surse de izolare: fragmente de organe, mai ales din sistemul nervos central (bulb, protuberanţă, cornul lui Amon, cerebel, emisferele cerebrale), secreţii, avortoni etc. Alte materiale: apă, sol.

Condiţii de cultivare: L. monocytogenes este aerob-anaerob facultativ, se dezvoltă bine la temperaturi între 20—40°C, pH 7—7,2. Se cultivă pe medii uzuale. Izolarea este deseori dificilă. S-au propus diferite metode care facilitează izolarea. Astfel, înainte de însămînţare se recomandă îmbogăţirea prin metoda unanim acceptată a lui Gray, 1948 (citat Wood, 1969), care constă în menţinerea materialului la frigider (+4°C) cîtva timp, chiar cîteva săptămîni. *L. monocytogenes* se multiplică la +4°C, în timp ce alte bacterii nu se pot multiplica. Wood (1969) recomandă următorul protocol de izolare: creier sau un

alt țesut se triturează și 1—20 grame din probă se repartizează în două balonașe cu cîte 100 ml mediu de îmbogățire KT. Un balon se incubează la 37°C, altul la 4°C. După 24—48 ore de incubare, 0,1 ml din probă se însămînțează pe suprafața unei plăci cu agar cu sînge (sînge cal 5%, agar NAB și agar triptoză Difco). Se incubează 24—48 ore. Dacă proba este negativă se continuă cu însămînțări în plăci din mediile de îmbogățire timp de 3 luni. Examinarea coloniilor pe medii solide se face în lumină oblică. Dacă materialul este puternic contaminat, însămînțările se fac pe medii cărora li se adaugă substanțe care le imprimă un caracter selectiv (clorură de sodiu 10%, telurit de potasiu 0,05—0,1%, verde briliant, thioglicolat de sodiu, prontosil, esculină, polimixină — după Darie, 1968). În culturi în medii lichide este transplantabil la 2 și chiar la 6 luni (Stamatin, 1957).

Identificare

Morfologie: bacil de 2—5 microni lungime, 0,5 microni grosime. În culturi vechi sau culturi tip R, pot apărea și forme filamentoase. În culturi recent izolate predomină forme cocoide avînd 0,5—1 micron diametru care se pot confunda uneori cu enterococii. Este mobil; pentru proba mobilității se recomandă metoda tuburilor în U; rezultatul se citește după 3 zile de incubare la 22°C. La 37°C, mobilitatea este absentă sau redusă. Nesporulat, necapsulat, Gram pozitiv, în culturi vechi se decolorează ușor. Este neacidorezistent.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate slabă și uneori depozit mic granular; medii semisolide (agar 0,25%, gelatină 0,8%, glucoză 1%) — se dezvoltă la 37°C în timp de 24 ore de-a lungul liniei de însămînțare, prezentînd zone neregulate de expansiune în mediu (aspect caracteristic după Seastone, citat Bergey,

1957); medii solide — pe geloza nutritivă, colonii mici, fine, semitransparente (sînt asemănătoare cu coloniile de *E. insidiosa*); pe mediul selectiv recomandat de Gray şi col. (cit. Merchant şi Packer, 1967), preparat din agar triptoză cu telurit de potasiu 0,05%, *Listeria* formează colonii negre cu nuanţă verzuie la periferie, în timp ce micrococii formează colonii roz-gălbui, cu centrul negru, iar streptococii colonii mici, roz-cenuşii. Pe agar triptoză se recomandă examinarea coloniilor în lumina albă transmisă oblic (Gray, 1948, cit. Wood, 1969).

Proprietăţi biochimice: fermentează intens glucoza, salicina şi trehaloza, mai slab maltoza, lactoza, dextrina, zaharoza, ramnoza, amidonul şi glicerolul; nu fermentează xiloza, manitolul, dulcitolul, inulina, inozitolul, arabinoza şi rafinoza. Nu reduce nitraţii, nu produce indol, nici H_2S, este catalază pozitiv, nu hidrolizează ureea, nu lichefiază gelatina, decolorează laptele turnesolat pe care-l acidifică fără să-l coaguleze. Pe agar cu sînge produce hemoliză beta.

Proprietăţi antigenice. Pe baza structurii antigenice, pot fi deosebite 3 sau 4 grupe serologice (Paterson, citat Merchant şi Packer, 1967). Pentru identificare se pot folosi reacţiile de aglutinare rapidă pe lamă, RAL şi RFC. Reacţiile se consideră pozitive cînd aglutinarea se produce la titrul de 1/320, iar RFC la 1/10 (Darie, 1972).

Rezistenţa: la temperatura de 58—59°C este distrus în 10 minute; în sol ar rezista 295 zile (Welshimer, citat Merchant şi Packer, 1967). În creier infectat, păstrat în glicerină soluţie 50%, rezistă 6 luni. Dezinfectantele uzuale sînt active.

Patogenitate: nu secretă exotoxine; patogenitatea se datoreşte virulenţei. În condiţii experimentale sînt sensibile mai multe specii de laborator, iar infecţia se poate reproduce pe diverse căi. Şoarecele, pe cale intranazală, face o infecţie mortală în 3—5 zile, iar intraperitoneal sau

subcutan (0,1—0,2 ml) în 2—6 zile. Pe căile intravenoasă şi intracerebrală (0,05—0,2 ml) infecţia este mortală în 1—5 zile. Iepurele inoculat cu 0,5—0,8 ml pe diverse căi face o infecţie mortală în 3—5 zile. Cobaiul este cel mai rezistent; inoculat intravenos cu 0,3—0,5 ml sau intraperitoneal cu 0,5—1 ml face o infecţie mortală iar inoculat subcutan cu 0,5 ml un edem local vindecabil. Şobolanul şi hamsterul sînt destul de rezistenţi. Găina, inoculată intracerebral sau intravenos, moare în 4—5 zile, dar porumbelul este rezistent. La animalele moarte în urma infecţiei experimentale, leziunile cele mai caracteristice sînt focarele necrotice în ficat. Pentru diagnostic, instilarea în sacul conjunctival (testul Pons-Julianelle) la cobai sau iepure, a 2—3 picături are un grad ridicat de specificitate; animalele reacţionează printr-o cheratoconjunctivită vindecabilă în 15—25 zile de la infecţie.

FAMILIA BACILLACEAE

În această familie, sînt încadrate speciile bacteriene sporogene. Ea cuprinde două genuri: genul *Bacillus*, din care fac parte speciile aerobe şi genul *Clostridium* care include speciile anaerobe.

Genul Bacillus

Specia B. anthracis

Numele comune: bacilul cărbunelui (bacteridia cărbunoasă).

Gazda receptivă şi infecţia naturală: sînt receptive marea majoritate a mamiferelor şi în rare cazuri şi unele specii de păsări (de ex., raţa). Infecţia produsă poartă

numele de antrax sau dalac. Speciile de animale domestice la care antraxul se întîlnește cel mai frecvent și are evoluția cea mai gravă sînt: ovinele, taurinele și cabalinele. Incidența bolii este mai redusă la suine și carnasiere.

Surse de izolare: organele cadavrelor infectate: sînge, splină, măduva oaselor lungi (infecția fiind septicemică bacteria este prezentă în toate organele); o sursă de izolare o reprezintă și pieile, chiar uscate, provenind de la animale infectate în care bacteriile se păstrează sub formă sporulată. Deși nișa ecologică a germenului este solul, izolarea din probe de sol este foarte dificilă, practic imposibilă.

Examenul microscopic direct: frotiurile din diverse organe sînt foarte bogate în bacili capsulați, dispuși izolat și în grupări strepto. Cele mai bogate în germeni sînt frotiurile din splină.

Condiții de cultivare: aerob, se dezvoltă în bulion și pe agar în 24 ore, la 37°C. Se păstrează în culturi (pe medii solide) sub formă sporulată foarte mulți ani. În vederea izolării din organele cadavrelor și animalelor sacrificate de necesitate, se recomandă însămînțări abundente. În scopul izolării din piei uscate, se raclează fața internă, praful obținut se suspendă în ser fiziologic, se încălzește la 60°C timp de 10 minute, apoi se însămînțează.

Identificare

Morfologie: germen de formă bacilară, avînd 3—10 microni lungime și 1—1,3 microni grosime, cu extremitățile tăiate drept, grupat de cele mai multe ori în lanțuri; lanțurile cele mai lungi se formează în culturile în medii lichide. În organism și pe medii cu sînge sau ser, bacteria elaborează o capsulă de natură polipeptidică (un polimer al acidului glutamic dextrogir). În medii obișnuite de cultură (bulion, agar), germenul nu capsulează. Este sporu-

lat, avînd sporul situat central, de formă ovală, cu diametrul transversal mai mic decît al celulei vegetative. Sporularea are loc în condiţii de aerobioză. De aceea, numărul cel mai mare de spori se găseşte în frotiurile de pe suprafaţa mediilor solide. În culturile lichide, numărul de spori este mai mic, iar în frotiurile organelor cadavrelor proaspăt deschise sporii lipsesc. În culturi, numărul sporilor creşte proporţional cu vechimea culturii. Limitele de temperatură între care bacteria sporulează sînt de 14—42,5°C. Neciliat, Gram pozitiv.

Caractere culturale: culturile în bulion prezintă diverse grade de turbiditate, în funcţie de lungimea lanţurilor. Aspectul tipic pentru tulpinile care formează lanţuri lungi este cel de cultură aglutinată, sub forma unui flocon de vată, mediul de cultură rămînînd limpede. Tulpinile care formează lanţuri mai scurte produc o turbiditate mai mult sau mai puţin accentuată. Pe suprafaţa agarului, coloniile sînt mari, neuniforme (pot ajunge la 6—7 mm diamentru), de tip R avînd suprafaţa mată şi marginile neregulate. Deseori, marginile prezintă expansiuni vizibile macroscopic (cornişoane); examinate la microscop cu obiectivul mic, marginile au aspectul de păr ondulat; coloniile sînt opace şi nepigmentate. În medii semisolide (gelatină, agar moale), în urma însămînţării cu acul prin înţepare, se obţine o cultură mai dezvoltată spre suprafaţa mediului şi mai săracă în profunzime (aspectul de brad răsturnat).

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, fructoza, zaharoza, maltoza, trehaloza şi dextrina. Unele tulpini fermentează slab glicerolul şi salicina. Nu fermentează arabinoza, ramnoza, manoza, galactoza, lactoza, rafinoza, inulina, manitolul, dulcitolul, sorbitolul, inozitolul şi adonitolul. Hidrolizează amidonul, reduce nitraţii în nitriţi, produce lecitinază, lichefiază gelatina. Coagulează laptele şi peptonizează apoi coagulul; în plăci cu agar-lapte hidrolizează cazeina.

Proprietăţi antigenice: specia este omogenă din punct de vedere antigenic şi înrudită serologic cu alte specii din genul *Bacillus*. Pentru evidenţierea germenului în organele cadavrelor (foarte bogate în bacili) se foloseşte cu bune rezultate reacţia de seroprecipitare după tehnica Ascoli (vezi pag. 323).

Rezistenţa: fiind sporulat este mult mai rezistent faţă de factorii fizici şi chimici în comparaţie cu bacteriile nesporulate. Prin încălzire la 65—70°C, sînt distruse formele vegetative, dar nu şi sporii. Sporii sînt distruşi la temperaturi de 100—120°C. Dintre dezinfectante, mai active sînt formolul şi sublimatul. Dintre antibiotice, *B. anthracis* este sensibil la penicilină, streptomicină (faţă de care majoritatea tulpinilor dau numeroase mutante rezistente), eritromicină, teramicină etc.

În prezenţa penicilinei, bacilii se transformă în protoplaşti rezultînd forme sferoidale mari, care în lanţ au aspectul unui şirag de perle. Această transformare morfologică, pe care bacilul o suferă în contact cu penicilina *in vitro*, este folosită în unele laboratoare ca test de diagnostic (Perlschnurtest).

Sensibilitate la bacteriofagi: din sol se izolează cu uşurinţă fagi activi faţă de *B. anthracis*. Cei mai mulţi sînt însă activi şi faţă de alte specii din genul *Bacillus* (*B. cereus* şi *B. mycoides*). De aceea, aceşti fagi au fost denumiţi fagi CAM (cereus-anthracis-mycoides). Există însă un număr restrîns de fagi specifici numai pentru *B. anthracis*, care pot fi folosiţi cu bune rezultate pentru diferenţierea acestei specii de celelalte specii din genul *Bacillus* şi mai ales de *B. cereus* prin test fagic (Stamatin şi Anghelescu, 1965).

Patogenitate: germenul îşi datoreşte patogenitatea în primul rînd virulenţei (capsula are un rol esenţial în crearea posibilităţilor de multiplicare ale bacteriei în organism), cît şi unei toxine constituită din trei componente;

cele trei fracţiuni ale toxinei sînt însă active numai în complex. Prin pierderea proprietăţii de a capsula (formarea de variante acapsulogene), cît şi prin pierderea capacităţii de a elabora toxina, germenul devine nepatogen. Variantele acapsulogene, dar toxigene, dau foarte bune rezultate ca tulpini vaccinale, datorită acţiunii imunizante a factorului II al toxinei. Tulpina 1190 R din care se prepară vaccinul anticărbunos folosit în ţara noastră (Stamatin, 1936) face parte din această categorie.

Toate animalele de laborator, cu excepţia porumbelului, sînt sensibile la infecţia cărbunoasă experimentală. Specia cea mai sensibilă este şoarecele, urmat de cobai, hamster şi iepure. Căile cele mai severe de inoculare sînt cea intradermică şi subcutanată.

Specia B. cereus

Gazda receptivă şi infecţia naturală: germen în majoritatea cazurilor nepatogen, răspîndit în medii naturale şi în organismul normal al omului şi animalelor. Este incriminat ca agent patogen al unor toxiinfecţii alimentare la om, al unor mamite la vacă şi al unor infecţii la insecte (varietatea patogenă pentru insecte este considerată de unii autori şi ca o specie aparte numită *B. thuringiensis).*

Surse de izolare: alimente, diverse organe, fecale, aer, sol etc.

Condiţii de cultivare: aerob, se cultivă în bulion şi pe agar, culturile fiind bine dezvoltate după 24 ore de incubare la 37°C.

Identificare

Morfologie: bacil asemănător cu *B. anthracis,* avînd 3—5 microni lungime şi 1—1,2 microni grosime, are capetele rotunjite; în frotiuri se dispune izolat sau în lanţuri scurte,

este necapsulat, posedă un bogat aparat ciliar (mobilitate accentuată la examenul între lamă şi lamelă al culturilor tinere în bulion), sporulat, Gram pozitiv.

Caractere culturale: bulion — turbiditate moderată sau intensă, necaracteristică; agar — colonii mari, neuniforme, opace, de tip R cu suprafaţa mată, margini neregulate, nepigmentate; aspectul cultural pe agar este deseori foarte asemănător cu cel al speciei *B. anthracis.*

Proprietăţi biochimice: fermentează constant glucoza şi în majoritatea cazurilor zaharoza, glicerolul şi salicina. Nu fermentează arabinoza, xiloza şi manitolul. De regulă, nu fermentează lactoza. Coagulează laptele, hidrolizează cazeina, hidrolizează amidonul, produce indol, reacţia Voges Proskauer pozitivă, reduce nitraţii, metabolizează citratul de sodiu ca unică sursă de carbon, produce lecitinază, este hemolitic.

Patogenitate: unele tulpini elaborează o toxină evidenţiabilă prin instilare intranazală la şoarece la care produce un efect mortal în cîteva ore (S t a m a t i n, 1965).

Specia B. larvae

Gazda receptivă şi infecţia naturală: produce loca americană la larvele de albine.

Surse de izolare: faguri cu larve prezentînd leziuni caracteristice pentru loca americană (culoare brună, capacele celulelor înfundate, conţinut brun, lipicios, filant).

Examen microscopic direct: în frotiurile din larvele moarte colorate de preferinţă prin metode simple (albastru de metilen, fucsină), se observă numeroşi spori de formă ovală.

Condiţii de cultivare: aerob, nu creşte în bulion şi pe agar simplu; rezultate bune se obţin prin însămînţări pe agar cu gălbenuş de ou (vezi pag. 240), pe medii cu ser

și pe agar glucozat cu sînge. Temperatura optimă este de 37°C; timp de dezvoltare, 2—3 zile.

Identificare

Morfologie: bacil lung și subțire de 2,5—5 microni lungime/0,5—0,8 microni grosime ciliat, avînd numeroși cili dispuși peritrich (la examenul între lamă și lamelă mobilitatea este foarte accentuată), necapsulat, sporulat, Gram pozitiv.

Caractere culturale: în medii lichide, produce o turbiditate necaracteristică și uneori inel la suprafață; pe medii solide formează colonii rotunde cu marginile mai opace decît centrul.

Proprietăți biochimice: fermentează glucoza, fructoza, galactoza, xiloza și salicina; are activitate redusă față de lactoză și zaharoză; nu fermentează manitolul și dulcitolul; nu hidrolizează amidonul, reduce nitrații în nitriți, nu produce indol.

Rezistență: sporii sînt foarte rezistenți și se păstrează în mediile naturale un timp îndelungat. Dintre substanțele chimioterapice este sensibil la sulfatiazol.

Alte specii din genul Bacillus

Genul *Bacillus* cuprinde 25 specii (*Bergey*, 1957). Multe din acestea sînt foarte răspîndite în natură (sol, apă, aer, organismul animal, plante etc.), ca de exemplu: *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. laterosporus*. *B. megatherium* etc. Aceste specii sînt nepatogene și nu prezintă interes decît în măsura în care pot crea confuzii cu speciile patogene. Cercetări de dată mai recentă privind caracterele diferențiale între speciile din genul *Bacillus* sînt cele ale lui Kundrat (1963) și Barjac și Bonnefoi (1972) (tabelul 21).

Testele de diferențiere între speciile din

Speciile din genul *Bacillus COHN*	Hidroliză						Voges-Proskauer	Reducere nitrați	Gaz din nitrați în anaerobioză
	Amidon	Cazeină	Gelatină	Arginină	Lecitină	Uree			
Bac. megaterium	+	+	+	—	—	+	—	—	—
Bac. cereus	+	+	+	—	±	V	+	±	±
Bac. cereus var. mycoides	+	+	+	—	±	V	+	±	±
Bac. thuringiensis	+	+	+	+	+	V	+	+	V
Bac. licheniformis	+	+	+	+	—	—	+	+	+
Bac. subtilis	+	+	+	—	—	—	+	+	—
Bac. subtilis var. aterrimus	+	+	+	—	—	—	+	+	—
	+	+	+	—	—	—	+	+	—
Bac. subtilis var. niger	—	+		—		—			
Bac. pumilus		+	+	+	—		+	—	—
Bac. coagulans	+	+	—	—	—	·	+	·	—
Bac. badius	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Bac. firmus	+	+	+	—	—	—	—	+	—
Bac. lentus	+	—	—	—	×	+	—	—	—
Bac. polymyxa	+	+	+	—	V	—	+	+	—
Bac. macerans	+	—	+	—	—	—	—	+	—
Bac. alvei	+	+	+	—	—	—	+	—	—
Bac. stearothermophilus	+	·	+	—	—	—	—	+	—
Bac. circulans	+	±	+	—	—	·	—	V	—
Bac. laterosporus	—	+	+	—	—	—	—	+	·
Bac. pulvifaciens	—	+	+	+	—	—	—	+	—
Bac. brevis	—	+	+	+	—	—	—	V	—
Bac. pantothenticus	+	+	+	+	×	—	—	V	—
Bac. sphaericus	+	V	+	—	—	V	—	—	—
Bac. pasteurii	—	·	+	+	—	+	—	+	V

Legendă: + = constant pozitiv; — = constant negativ; de regulă negativ
· = predominant negativ; *V* = variabil; *x* = îndoielnic pozitiv.

genul Bacillus (după Kundrat, 1963)

Metabolizarea nitraţilor	Producţie de gaz (glucoză)	Dezv. în glucoză în cond. anaerobe	Activitatea fermentativă: Glucoză	Lactoză	Maltoză	Manitol	Salicină	Dezvoltare la: 7 % NaCl	10 % NaCl	56 °C	65 °C	Inhibare prin sulfonamide	Indol
+	—	—	+	—	+	±	±	+	+	—	—	—	
—	—	+	+	V	+	—	+	+	—	—	—	—	
—	—	+	+	V	+	—	+	—	—	—	—	—	
—	—	+	+	·—	+	—	+	+	+	—	—	—	
+	·	+	+	·—	+	+	+	+	+	+	—	—	
+	—	—	+	·—	—	+̣	+	+	+	—	—	—	
+	—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	
+	—	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	
+	—	—	+	—	—	+̣	+	+	V	—	—	—	
—	—	+	+	+	+	—	V	+	+	+	—	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
—	—	—	+	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—
—	—	—	+	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—
—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
—	+	+	+	V	·—	+̣	—	—	—	—	—	—	—
—	·	+	+	—	+	·—	+	—	—	—	—	+	+
—	—	+	+	—	+	·—	—	—	—	+	+	+	—
—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	V	—	—	—
—	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+	+̣
—	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
V	—	—	+	—	—	—̣	—	—	—	V	—	—	—
V	—	·	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
—	—	·	—	—	·—	—	+	+	+	—	—	—	

+̣ = de regulă pozitiv; : = foarte slab pozitiv; ± = predominant pozitiv;

Genul Clostridium

Specia Cl. tetani (Plectridium tetani, Bacillus tetani)

Numele comun: bacilul tetanic.

Gazda receptivă şi infecţia naturală: tetanosul se întîlneşte la om şi diferite specii de animale. Dintre animale calul este cel mai receptiv urmînd, în ordinea descrescîndă a sensibilităţii, porcul şi apoi cîinele. Bovinele şi ovinele fac infecţia foarte rar, iar păsările, îndeosebi găina, sînt foarte rezistente. *Cl. tetani* este răspîndit în natură; se găseşte în sol şi în conţinutul intestinal la om şi animale.

Surse de izolare: plăgi tetanigene ale animalelor bolnave (izolarea este însă foarte dificilă), fecale, probe de sol.

Examenul microscopic direct nu se practică dat fiind raritatea germenului şi abundenţa florei microbiene de asociaţie. Examenul bacterioscopic al plăgii sau al altor materiale nu oferă elemente de diagnostic deoarece există germeni nepatogeni foarte asemănători cum sînt: *Cl. tetanomorphum*, *Cl. sphenoides*, *Cl. tetanoides*, *Cl. tetani* nu se găseşte nici în frotiurile din organele animalelor moarte de tetanos. Microbul nu este evidenţiabil deoarece se multiplică numai la nivelul porţii de intrare şi nu difuzează în organism.

Condiţii de cultivare: se cultivă numai în condiţii de anaerobioză. Temperatura optimă este 37°C, pH optim 7—7,6. Pentru a pune în evidenţă bacilii în sol sau în materii fecale, se inoculează materialul în amestec cu o soluţie de 1% de $CaCl_2$ la şoarece sau cobai. Se consideră pozitive probele care produc tetanizarea animalului. Tulpinile izolate direct din medii naturale nu sînt toate toxigene pe mediile de cultură (S t a m a t i n, 1965). În vederea izolării bacteriei din ţesutul excizat din plagă, se triturează în prealabil materialul, se suspendă în ser fiziologic, iar suspensia obţinută se împarte în două: o parte se încălzeşte la 100°C timp de 3 minute; din ambele se însămînţează dife-

rite medii pentru anaerobi (VF, VL glucozat sau Rosenow cisteinat) şi se incubează 4—5 zile la 37°C. Pentru confirmarea diagnosticului se inoculează subcutan la cobai sau şoarece, fie 1 ml suspensie din materialul patologic, fie 0,25 ml din supernatantul culturii centrifugate. În cazul reacţiei pozitive, se observă tetanos tipic, iar moartea animalului survine în 48 ore. Pentru diferenţierea de alte toxine se face proba seroneutralizării cu ser antitetanic specific.

Identificare

Morfologie: bacil de 4—8 microni lungime şi 0,4—0,6 microni grosime, cu capetele rotunjite, izolat sau grupat în lanţuri scurte, rareori filamente. Sporulat; sporul este rotund sau oval situat terminal. Este mobil avînd numeroşi cili dispuşi peritrich. Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate slabă cu producţie de gaz. Unele tulpini sedimentează, mediul rămînînd limpede; medii solide — în suprafaţă, colonii mici, transparente, cu margini neregulate; în profunzime (geloză Veillon), colonii sferice, pufoase, deseori cu un nucleu central.

Proprietăţi biochimice: după Bergey, 1957, glucoza şi alte substanţe hidrocarbonate nu sînt fermentate; după Prevot (1955), *Cl. tetani* fermentează unele zaharuri ca glucoza, maltoza, zaharoza, dar fermentarea este mascată de alcalinizarea simultană a mediului. Este hemolitic, slab proteolitic. Nu coagulează laptele, nu atacă cazeina, reduce nitraţii. Producţia de indol este negativă după unii autori (Bergey, 1957), pozitivă după alţii (Nestorescu, 1965). Reacţiile roşului metil şi Voges Proskauer sînt negative.

Proprietăţi antigenice: fiind mobil, *Cl. tetani* posedă antigeni O şi H. Antigenul O este comun tuturor tulpinilor din această specie şi este înrudit cu antigenul O al speciei

Cl. tetanomorphum (nepatogen). Antigenele H sînt diferite şi permit diferenţierea a 10 tipuri serologice prin reacţia de aglutinare şi R F C Toate tipurile serologice elaborează însă aceeaşi toxină, serul antitoxic preparat cu o tulpină neutralizează toxina secretată de oricare din serotipuri (T u l l o c h, 1918, citat N e s t o r e s c u, 1965).

Pentru identificarea germenului izolat din material patologic metoda cea mai sigură este proba seroneutralizării: se amestecă 10 doze test de toxină cu 10 unităţi antitoxice ser antitetanic, se ţine amestecul timp de o oră la 37°C şi se inoculează cîte 2 şoareci subcutan cu cîte 1 ml amestec. Dacă animalele supravieţuiesc prezenţa toxinei este demonstrată. În caz contrar, şoarecii mor în 48 ore.

Rezistenţa: sporii de *Cl. tetani* sînt rezistenţi la acţiunea factorilor fizici şi chimici. Rezistă un timp nedefinit la uscăciune. U n g u r e a n u şi G r e c i a n u (1960) au reuşit să izoleze germenul din cordonul ombilical al unui copil mort de tetanos, după 55 ani de conservare a materialului în laborator. Sporii rezistă o oră la temperatura fierberii; timp de 3—25 minute la 105°C şi 15—20 minute la autoclavare (120°C). Este rezistent faţă de dezinfectanţii obişnuiţi (supravieţuieşte 15 ore în soluţie de fenol 5%). Lumina solară directă distruge sporii în 24 ore, iar lumina difuză omoară sporii în 5 zile. Apa oxigenată este activă: în concentraţie 1—2% omoară sporii în 24 ore, iar în concentraţie de 30% în 5 minute.

Patogenitatea se datoreşte toxicităţii. *Cl. tetani*, rămîne de regulă la poarta de intrare unde sporii se transformă în forme vegetative, dacă găsesc condiţii favorabile de anaerobioză. Germenul se multiplică la nivelul porţii de intrare, elaboreoză toxina care difuzează în organism, exercitîndu-şi efectul neurotoxic. În condiţii experimentale inocularea culturilor de *Cl. tetani* sau a filtratelor la animale de laborator provoacă apariţia simptomelor tipice de tetanos. Şoarecele este deosebit de sensibil. În afară de

șoarece, se poate folosi cu bune rezultate și cobaiul. Inocularea se face de preferință intramuscular la unul din membrele posterioare. Într-un interval de timp care este în funcție de gradul de toxicitate al tulpinii (1—2 zile), apare tetanosul la nivelul membrului la care s-a făcut inocularea; acesta se imobilizează într-o poziție fixă de extensie latero-posterioară, apoi contracțiile se extind și la membrul pereche (animalul are o poziție caracteristică de focă). De la nivelul membrelor posterioare, tetanosul progresează spre trenul anterior și animalul moare în momentul cînd intră în tetanie mușchii respiratori. Leziunile cadavrelor nu sînt caracteristice, dar tabloul clinic descris mai sus caracterizat ca „tetanos ascendent" este patognomonic.

Specia Cl. botulinum (Bacillus botulinus)

Numele comun: bacilul botulinic

Gazda receptivă și infecția naturală: Cl. botulinum este un germen saprofit și, în condiții de anaerobioză, produce o toxină responsabilă de o intoxicație foarte gravă la om și animale. Intoxicația, numită botulism, are loc în urma consumului de alimente, respectiv furaje în care a fost în prealabil elaborată toxina.

Surse de izolare: alimente, mai ales conserve, furaje (uneori siloz), probe sol.

Examen microscopic direct nu se practică; intoxicația se produce deseori în absența germenului și numai cu toxina existentă în alimente sau furaje.

Condiții de cultivare și izolare: microbul se cultivă în anaerobioză. Temperatura de dezvoltare este 20—40°C (nu la 45°C), optim 25—30°C, pH neutru. Izolarea germenului din alimente, furaje este destul de dificilă. Se recoltează mai multe probe din alimentul incriminat, se triturează, se

face o suspensie în soluție fiziologică și se însămînțează în bulion VF glucozat; se încălzește cîteva minute la 100°C, apoi se incubează la 33°C. Willis (citat Katisch, 1965) recomandă ca mediul însămînțat să fie încălzit la 80°C timp de 30 minute și incubat la 35°C timp de 5—10 zile. Pentru a împiedica dezvoltarea altor bacterii se poate adăuga neomicină.

Identificare

Mofologie: bacil de 3—9 microni lungime și 0,9—1,2 microni grosime, cu capetele rotunjite, izolat, perechi sau în lanțuri scurte. Sporulat; sporul este oval, situat subterminal (diametrul sporului depășește lățimea bacilului, ceea ce face ca bacilii sporulați să aibă forma de sticlă de lampă. Este mobil, avînd 4—8 cili dispuși peritrich, Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate accentuată; după învechire germenii se depun și mediul se limpezește; medii solide — pe suprafața agarului cu sînge (în anaerobioză) colonii neregulate, mici, translucide, albe-cenușii, lucioase cu margini neregulate; în profunzime (geloza Veillon) — colonii cu aspect variabil, în general mari, lenticulare, biconvexe sau plate, cu un nucleu central opac și arborizații fine în jur.

Proprietăți biochimice: comportarea față de substanțele hidrocarbonate este în general inconstantă variind cu tipul și cu tulpina; coagulează laptele turnesolat, este hemolitic, lichefiază gelatina; albușul de ou este digerat de unele tulpini. Nu produce indol, produce H_2S, nu reduce nitrații. Reacțiile roșului metil, Voges Proskauer și catalazei sînt negative.

Proprietăți antigenice: prin seroaglutinare, pe baza antigenilor flagelari, s-au putut diferenția mai multe tipuri serologice. Pe baza proprietăților antigenice ale toxinei,

tulpinilé de *Cl. botulinum* se pot împărți în mai multe tipuri: A, B, C, D și E.

Rezistența: sporii sînt foarte rezistenți: supraviețuiesc 6 ore la 100°C, 10 minute la 120°C; sînt distruși sub acțiunea formolului 0,5% în 24 ore, a acidului clorhidric într-o oră. Nu germinează în soluție de NaCl 10% și nici în mediu acid.

Toxina botulinică apare în medii de cultură în a 5—9-a zi; temperatura optimă pentru toxinogeneză este de 25—35°C. Rezistă la acțiunea acizilor și a sucului gastric, se distruge la pH peste 8. Față de căldură, toxinele diverselor tipuri antigenice se comportă diferit: la 80°C unele se distrug în 5 minute, iar altele în 60 minute. Toxina din conserve poate fi distrusă prin încălzire în 20 minute la 100°C. Lugolul, permanganatul de potasiu, alcoolul o inactivează (alcoolul administrat imediat după ce un animal a ingerat o cantitate de toxină previne intoxicația — S t a m a t i n, 1957).

Patogenitate: În condiții experimentale, toxina obținută prin filtrarea culturilor în medii lichide este activă pentru animale de laborator: șoarece, cobai, iepure. Intoxicația se realizează prin administrarea toxinei pe diverse căi: la iepure, calea intravenoasă este cea mai severă; la administrare pe cale bucală. animalul este mai rezistent.

Punerea în evidență și determinarea tipului de toxină: diagnosticul bacteriologic al botulismului fiind dificil, diagnosticul de laborator al acestei intoxicații constă în majoritatea cazurilor în punerea în evidență a toxinei în conținutul stomacal, alimente, furaje. Prezența toxinei în serul bolnavilor este foarte rară. Pentru punerea în evidență a toxinei se procedează astfel: probele se diluează în ser fiziologic, se centrifughează și lichidul supernatant se inoculează la mai mulți șoareci intraperitoneal în doze de 0,5 ml. Materialul suspect poate fi administrat și subcutan la șoarece sau *per os* la cobai. Dacă toxina este pre-

zentă apar simptome de paralizie și în final animalele mor (șoarecii la cîteva ore, cobaii la 2—3 zile). Pentru tipizarea tulpinii se inoculează 5 șoareci, fiecare cu 2 pînă la 10 doze minime mortale de toxină și apoi cu cîte 1/10 unități antitoxice din serurile antibotulinice de tip A, B, C, D, E (cîte un ser antitoxic de șoarece). Șoarecele care a rezistat indică tipul serului care l-a protejat. Tipizarea se poate face și *in vitro* prin reacția de precipitare în gel.

Specia Cl. chauvoei

Numele comun: bacilul cărbunelui emfizematos, simptomatic sau bacterian

Gazda receptivă și infecția naturală: este agentul etiologic al cărbunelui emfizematos sau simptomatic, infecție întîlnită mai frecvent la taurine și mai rar la ovine și suine.

Examenul microscopic direct: în frotiurile executate din mușchii cu leziuni și colorate cu metoda Gram, se observă bacili Gram pozitivi, sporulați, cu sporul situat central sau subterminal.

Surse de izolare: tumori emfizematoase, os lung cu măduvă, ganglionii regionali aferenți leziunii.

Condiții de cultivare: este strict anaerob, se cultivă pe medii pentru anaerobi sau pe agar cu sînge în anaerobioză. Temperatura optimă este 37°C, pH 7,8—8,2. Pentru izolare, mediile însămînțate se încălzesc la 70°C timp de 10 minute sau se incubează la 46—47°C pentru a se elimina flora de asociație (S t a m a t i n, 1965). Se poate folosi în același scop și metoda biologică: se inoculează intramuscular 2 cobai cu cîte 0,5—1 ml din țesutul muscular mojarat și suspendat în ser fiziologic. Animalele în agonie se sacrifică și se fac însămînțări din organe.

Morfologie: bacil avînd 3—8 microni lungime/1 micron grosime izolat, în grupări diplo sau lanţuri scurte. Sporul, situat central sau subterminal, deformează celula vegetativă. *Cl. chauvoei* este mobil datorită prezenţei cililor situaţi peritrich; Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură mediul uniform; medii solide — în geloza Veillon simplă, de regulă, nu se dezvoltă; în geloza Veillon cu ser cultura se răspîndeşte în toată masa mediului, care devine uşor opac respectînd o zonă superficială de 0,5 cm în care mediul rămîne limpede. În geloza Veillon cu ser antichauvoei dispersarea germenului este împiedicată, serul inhibînd mobilitatea şi bacilul formează colonii mici, punctiforme sau colonii mari. sferice, cu diametrul de 2—5 mm, cu aspect de puf de păpădie (S t a m a t i n, 1957). Pe agar cu sînge în anaerobioză — colonii rotunde sau neregulate, înfundate în mediu şi înconjurate de o zonă slabă de hemoliză.

Proprietăţi biochimice: fermentează cu producţie de gaz glucoza, fructoza, galactoza, maltoza, lactoza; nu fermentează inulina, salicina, manitolul, glicerolul şi dextrina. Nu produce indol, nu lichefiază serul coagulat, dar produce gelatinoliză; majoritatea tulpinilor coagulează încet laptele în 2—40 zile.

Proprietăţi antigenice: după unii autori, în cadrul speciei ar exista un singur tip serologic, după alţii, tulpinile de tip bovin şi ovin au antigeni somatici comuni, dar antigenii flagelari sînt specifici. Unele tulpini de *Cl. chauvoei* au antigen comun cu *Cl. septicum*.

Rezistenţa: sporii se conservă ani de zile în ţesut tumoral triturat şi uscat. Rezistă la putrefacţie (a fost izolat după 3 luni din cadavrele animalelor moarte de cărbune emfizematos şi îngropate). Sporii din culturi tinere rezistă la 70°C timp de 30 minute; sporii din culturi de 4 zile

rezistă 2 ore la 80°C și 3 minute la 100—105°C. În probe de sol, sterile și păstrate la temperatura camerei, rezistă ani de zile.

Patogenitatea se datorește virulenței și toxicității. Secretă exotoxine și filtratul culturilor în medii lichide omoară cobaiul inoculat intramuscular (0,5—1 ml), intravenos (0,5—2 ml) sau subcutan (4 ml) și șoarecele inoculat intravenos (1 ml).

În frotiurile de pe suprafața ficatului cobailor morți în urma infecției experimentale, bacilii sînt izolați, spre deosebire de *Cl. septicum* care formează filamente lungi. Iepurele și șobolanul sînt rezistenți.

Specia Cl. septicum (Cl. oedematis maligni)

Numele comun: Vibrionul septic

Gazda receptivă și infecția naturală: Cl. septicum este unul din agenții gangrenei gazoase traumatice la om și la numeroase specii animale (cal, măgar, porc, oaie, capră, iepure, găină, rață, porumbel, șobolan, șoarece etc.). La ovine, poate produce și o infecție care are uneori caracter enzootic numită bradsot sau braxy, iar la porc edemul malign caracterizat prin leziuni la nivelul stomacului și musculaturii.

Surse de izolare: țesut muscular cu leziuni de gangrenă gazoasă, organe cu leziuni în cazul bradsotului sau edemului malign. Alte materiale: conținut intestinal de la om și animale, probe de sol.

Examen microscopic direct: în frotiurile din leziuni, *Cl. septicum* apare ca un bacil lung și gros, izolat sau sub formă filamentoasă; bacteriile sporulate au aspect de navetă sau lămîie.

Condiții de cultivare și izolare: se dezvoltă în mediile curent folosite pentru cultivarea anaerobilor sau pe agar

cu sînge în condiţii de anaerobioză, temperatura optimă este 37°C.

Identificare

Morfologie: bacil de 3—8 microni lungime şi 0,6—0,8 microni grosime, cu capetele rotunjite, izolat sau grupat perechi sau în lanţuri scurte; în exsudatele din organismul animalelor bolnave predomină lanţurile şi filamentele. Este sporulat, sporii sînt ovali, situaţi central sau subterminal deformînd celula vegetativă. Mobil, datorită prezenţei a numeroşi cili dispuşi peritrich, Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — se dezvoltă abundent cu producţie intensă de gaze în primele ore; în culturi mai vechi mediul se clarifică şi apare un depozit; medii solide în profunzime — colonii pufoase, rotunde cu prelungiri laterale; pe suprafaţa agarului în plăci (în anaerobioză) colonii mici, transparente. Sporii se conservă timp îndelungat (peste 20 ani) în tuburi închise în vid (Stamatin, 1957).

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza, galactoza, levuloza, lactoza, maltoza, salicina şi este inactiv faţă de glicerol, manitol, dulcitol, izodulcitol, zaharoză şi inulină. Nu produce indol, reduce laptele turnesolat şi îl coagulează, dar nu lichefiază coagulul; lichefiază gelatina, dar nu serul coagulat, reduce nitraţii, este hemolitic.

Proprietăţi antigenice: Cl. septicum posedă antigeni somatici şi flagelari. Prin seroaglutinare s-au identificat 6 grupe serologice. Are antigeni sporali comuni cu *Cl. chauvoei* (Moustardier, 1968).

Rezistenţa: sporii rezistă la 100°C timp de 2—15 minute şi la 80°C peste o oră.

Patogenitate: Cl. septicum este toxic şi virulent. Toxina elaborată de *Cl. septicum* este termolabilă, de natură pro-

teică și este constituită din 4 fracții: α (letală, necrotică și hemolitică), β (o dezoxiribonuclează), γ (o hialuronidază) și δ (o hemolizină). Secreția toxinei *in vitro* este condiționată de o serie de factori dintre care glucoza este factorul esențial (Bittner 1958, citat de Stamatin 1965). Toxina este reținută de filtre; de aceea pentru separarea ei de corpii microbieni se recomandă centrifugarea. Este toxică pentru cobai (intravenos, subcutan), șoarece și iepure (intravenos). Infecția experimentală cu cultură integrală se poate reproduce la cobai (0,1—1 ml intramuscular, subcutan), porumbel (intramuscular), iepure (0,1—1 ml intramuscular), șoarece. La cobaii morți în urma infecției experimentale, în frotiurile de pe suprafața ficatului germenul apare sub forma unor filamente foarte lungi, aspect care poate fi considerat patognomonic, printre criteriile de identificare ale acestei specii.

Specia Cl. novyi (Cl. oedematiens)

Gazda receptivă și infecția naturală: Cl. novyi este unul din principalii agenți ai gangrenelor gazoase traumatice la om și animale (îndeosebi la cal). La ovine, produce hepatita necrotică, dar se izolează și din alte afecțiuni (edemul capului la berbec sau diverse plăgi traumatice).

Surse de izolare: organe (ficat, splină, os lung) care trebuie să fie proaspete, altfel diagnosticul este îngreuiat datorită prezenței altor anaerobi care invadează repede cadavrul. Alte materiale: probe de sol, fecale și eventual unele produse animale (de ex., intestine uscate de oaie, după Stamatin, 1965).

Condiții de cultivare, izolare: se cultivă în medii pentru anaerobi sau pe agar cu sînge în anaerobioză. Temperatura optimă este 35—38°C, pH 7,8.

Morfologie: bacil de 2,5—5 microni lungime şi 0,8—0,9 microni lăţime, izolat sau grupat în lanţuri scurte, rareori lungi. Sporii sînt ovali, situaţi obişnuit subterminal. Este mobil, are cili numeroşi aşezaţi peritrich, Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură intens mediul; în culturi vechi mediul este limpede, fiind prezent un mic depozit; medii solide, în profunzime — colonii de forme variate, cu centrul rotund sau lenticular opac, înconjurat parţial sau complet de arborizaţii fine. Pe agar cu sînge, în anaerobioză coloniile au centrul opac şi marginile neregulate, constituite dintr-o împletitură densă de filamente (Stamatin, 1957).

Proprietăţi biochimice: fermentează glucoza şi levuloza, inconstant maltoza, zaharoza, galactoza, lactoza şi glicerolul. Lichefiază gelatina glucozată 2%, nu lichefiază serul coagulat, nu produce indol, nici H_2S, este hemolitic.

Proprietăţi antigenice: specia este omogenă antigenic din punct de vedere somatic. S-au putut însă deosebi mai multe tipuri antigenice pe baza antigenilor flagelari.

Patogenitate: se datoreşte toxicităţii şi virulenţei. Filtratele sînt toxice pentru şoarece, cobai şi iepure, pe cale intravenoasă.

Toxina este constituită din mai multe fracţii şi în funcţie de prezenţa calitativă şi proporţiile cantitative dintre componenţii toxinei, cît şi de alte proprietăţi ale acesteia s-au diferenţiat în cadrul speciei trei tipuri:

— tipul A conţine fracţiile toxice alfa, gamma şi epsilon şi se izolează din gangrena gazoasă şi hepatita necrotică de la om;

— tipul B (denumit şi *Bacillus gigas*) conţine fracţiile alfa, beta şi zeta şi se izolează din cazuri de hepatită necrotică de la oaie;

— tipul C conţine fracţiile alfa, beta, gamma şi se izolează din cazuri de osteomielită.

Infecţia experimentală cu culturi integrale poate fi reprodusă la cobai (subcutan, intramuscular), şoarece, şobolan şi iepure.

Specia Cl. perfringens (Clostridium welchii, Welchia perfringens)

Gazda receptivă şi infecţia naturală: Cl. perfringens este răspîndit în natură, unde se găseşte în sol şi în tubul digestiv al animalelor. Este unul din agenţii gangrenelor gazoase la om şi animale şi provoacă la mai multe specii animale şi om infecţii intestinale: enterotoxiemia anaerobă a oilor, dizenteria anaerobă a mieilor, dizenteria aerobă a porcului, enterotoxiemii la viţei, iepuri de casă, carnasiere şi mînji. La om, poate produce toxiinfecţii alimentare.

Sursa de izolare: conţinut intestinal, fragmente de organe (ficat, rinichi, ganglioni mezenterici).

Examen microscopic direct: în frotiuri colorate cu metoda Gram se văd bacili Gram pozitivi, scurţi şi groşi.

Condiţii de cultivare şi izolare: se cultivă pe medii anaerobe: mediul VF, VL, Tarozzi etc. şi pe agar cu sînge (incubat în condiţii de anaerobioză). Pentru izolare, unii autori (M o u s t a r d i e r 1968) recomandă mediul Wilson Blair cu alaun de fier, pe care în cîteva ore apar coloniile evidente, mari, negre. De asemenea, pentru izolare, dar şi pentru identificarea rapidă a tulpinilor de *Cl. perfringens*, M o u s t a r d i e r (1968) indică mediul Willis (un mediu gelozat-lactozat la care se adaugă roşu fenol şi o suspensie sterilă de gălbenuş de ou diluat în apă distilată). Mediul se toarnă în cutii Petri şi după solidificare, pe o jumătate a suprafeţei mediului se etalează 3 picături de ser antiperfringens cu 600 U.A./ml şi apoi se însămîn-

ţează, tulpinile de identificat în linii paralele, perpendicular pe zona îmbibată cu ser. Coloniile lactozo-pozitive sînt gălbui, iar cele ce posedă o lecitinază se înconjoară de o zonă de precipitare albă şi opacă. Dacă în placă se dezvoltă colonii de *Cl. perfringens*, se observă acest aspect numai pe jumătatea plăcii fără ser antiperfringens; în cealaltă jumătate pe care s-a etalat în prealabil serul, cultura nu se dezvoltă.

Cl. perfringens se dezvoltă la 37—47°C: temperatura optimă este de 43—45°C. Pentru izolarea bacteriei Săsărman şi Horodniceanu (1961) recomandă ca după însămînţarea în bulion cu carne şi incubare timp de 5—6 ore la 37°C să se facă transplantări pe plăci cu agar sînge, care la rîndul lor trebuie menţinute în anaerobioză timp de 24 ore la 47°C.

Identificare

Morfologie: bacil scurt şi gros, 4—8 microni lungime şi 1—1,5 microni grosime, destul de uniform ca formă şi dimensiuni, izolat, uneori grupat în lanţuri scurte. Sporulează în medii de cultură şi în organism, însă sporul este greu evidenţiabil în frotiuri. Are o poziţie centrală sau subterminală şi nu deformează forma vegetativă. Capsulează în organism şi în medii care conţin ser, dar capsula nu se poate pune în evidenţă prin metode obişnuite. Este vizibilă în frotiuri executate într-un amestec de apă fiziologică cu ser sangvin, colorate prin metoda Casares Gill (de colorare a cililor). Este imobil, Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — tulbură intens şi uniform mediul formînd deseori o spumă abundentă la suprafaţă; în profunzimea mediilor solide formează colonii de dimensiuni variabile cu aspect lenticular-discoidal.

Proprietăţi biochimice: fermentează cu producţie de gaz glucoza, fructoza, galactoza, manoza, maltoza, lactoza,

xiloza, trehaloza, rafinoza şi neregulat inulina, salicina; nu fermentează manitolul. Nu produce indol, produce H_2S, reduce nitraţii, lichefiază gelatina în 1—3 ore, produce hemoliză. *Cl. perfringens* produce lecitinază, lipază şi hialuronidază. Coagulează laptele cu formare de coagul spongios.

Proprietăţi antigenice: toate tulpinile de *Cl. perfringens*, indiferent de tip, posedă un antigen somatic comun (Moustardier, 1968). Tulpinile tipului A posedă un antigen capsular comun şi antigeni somatici care permit diferenţierea tipului A în 8 tipuri serologice (Moustardier, 1968).

Rezistenţa: sporii se distrug la 100°C în 2—3 minute exceptînd tipul „F" la care sporii rezistă pînă la 2 ore. *Cl. perfringens* este sensibil la antibiotice şi sulfamide.

Patogenitatea: Cl. perfringens îşi datoreşte patogenitatea toxicităţii şi virulenţei. Toxina este secretată *in vivo* şi *in vitro*, producţia *in vitro* fiind condiţionată de tulpină, mediile de cultură, temperatura de incubare (optimum 37—40°C). Este de natură proteică şi are o structură complexă. Titrarea toxinei se face prin inoculări intravenoase la şoarece.

Patogenitatea tulpinilor de *Cl. perfringens* este variabilă; în general, tulpinile izolate din sol sînt mai puţin patogene în comparaţie cu cele izolate de la animalele bolnave. Tulpinile patogene omoară cobaiul (intramuscular 0,01—1 ml cultură de 24 ore), şoarecele (intravenos), porumbelul (intramuscular 0,001—0,05 ml), iepurele (intravenos).

Toxina secretată de *Cl. perfringens* are o structură complexă şi s-au putut separa 11 factori (notaţi cu literele alfabetului grecesc) cu acţiuni diferite; de exemplu factorul α este asimilat unei lecitinaze care are şi o acţiune letală, necrotică şi hemolitică; factorii $\beta, \gamma, \delta, \varepsilon$, sînt letali, necrotici (β şi ε) şi hemolitici (δ).

Pe baza factorilor constituenţi ai toxinei s-au diferenţiat în cadrul speciei *Cl. perfringens* 6 tipuri toxigene notate cu literele A, B, C, D, E, F.

TABELUL 22

Tipurile toxigene de Cl. perfringens
(Popovici şi Stamatin, 1968)

Tipul toxigen	Sinonimul	Infecţia naturală	Componentele toxinei în ordinea importanţei
A (uman)		Gangrena gazoasă	α
B (ovin)	*Cl. perfringens* (*agni*)	Dizenteria mieilor	β, α, γ, ε, δ
C (ovin)	*Cl. perfringens* (*paludis*)	Enteroroxiemia oilor	β, α, δ, γ
D (ovin)	*Cl. perfringens* (*ovitoxicus*)	Enterotoxiemia oilor (boala rinichiului moale)	ε, α
E (viţei)	*Cl. perfringens* (*vitulitoxicus*)	Enterotoxiemia viţeilor	α
F (uman)	*Cl. perfringens* (*hominitoxicus*)	Enterita necrozantă om	β, γ, α

Pentru tipizarea tulpinilor de *Cl. perfringens* se foloseşte reacţia de neutralizare a toxinei cu seruri antitoxice specifice (antitoxine).

Examenul toxicităţii se face prin inocularea intravenoasă la şoarece a 0,5 ml din supernatantul culturilor obţinute după centrifugare la 3 000 turaţii/minut timp de 30 minute.

Dacă toxina este prezentă, șoarecii mor în cîteva minute pînă la 3—4 ore.

Pentru stabilirea diagnosticului de dizenterie anaerobă a mieilor, proba toxicității se poate executa și direct din materialul patologic (conținut intestinal). În acest caz, materialul se diluează cu un volum egal de apă fiziologică, apoi amestecul se centrifughează 30 minute la 3 000 turații/minut. Lichidul supernatant se inoculează ca atare și diluat 1/2, 1/4, 1/8 etc. intravenos la șoarece în doze de 0,5 ml.

Proba seroneutralizării pentru tipizarea tulpinilor de Cl. perfringens. O cantitate (de ex., 0,5 ml) de lichid toxic (supernatant cultură sau conținut intestinal) se amestecă cu o cantitate de ser de tip (de ex., 1 ml din diluția 1/5 ser de tip A, B, C etc.) și se lasă o oră la 37°C. După acest interval, se inoculează 0,5 ml din amestec intravenos la șoarece. În cazul cînd tulpina corespunde tipului de ser folosit pentru neutralizare, șoarecii rezistă.

Specia Cl. histolyticum

Gazda receptivă și infecția naturală: este un microb de asociație în gangrena gazoasă umană; a fost izolat de Ungureanu și Greceanu (1956) dintr-un caz de edem al capului la berbec.

Sursa de izolare: leziuni de gangrenă gazoasă la om, mai rar la animale (cabaline). Alte materiale: probe de sol (se izolează rar).

Condiții de cultivare: este anaerob; se cultivă pe medii pentru anaerobi și pe agar cu sînge în anaerobioză.

Identificare

Morfologie: bacil de 3—5 microni lungime și 0,5—0,8 microni grosime, izolat sau în grupări diplo. Sporul este

situat subterminal, mai rar central, deformează forma vegetativă. Este ciliat, cu cili numeroși dispuși peritrich, Gram pozitiv.

Caractere culturale: medii lichide — turbiditate uniformă: uneori formează flocoane sau depozit granular; medii solide în profunzime — colonii de 1—2 mm cu un centru opac și arborizații în jur; pe suprafața agarului cu sînge în anaerobioză — colonii mici, rotunde, înfundate în mediu, incolore sau colorate în gri; se dezvoltă încet și sînt înconjurate de o zonă de hemoliză.

Proprietăți biochimice: nu fermentează substanțele hidrocarbonate. Este intens proteolitic: lichefiază gelatina, serul coagulat, digeră *in vitro* fragmente de ficat, mușchi, tendon și albuș de ou fiert. Nu reduce nitrații.

Patogenitate: secretă o exotoxină citolitică, care produce o necroză locală. În filtratul culturilor s-au pus în evidență trei componente toxice: alfa (cu efect letal și necrotic), beta (o colagenază) și o proteinază. Toxina inoculată intravenos la iepure în doză de 1—2 ml omoară animalul în cîteva minute, inoculată intramuscular la cobai și iepure produce o mioliză intensă pînă la denudarea osului.

Infecția experimentală cu cultură integrală în mediu lichid se poate obține la cobai, iepure, șoarece. Cobaiul inoculat intramuscular cu 1—2 ml prezintă o leziune locală caracteristică, țesutul muscular se lichefiază, razele osoase rămînînd denudate chiar în timpul vieții animalului, în ultima fază a bolii. Uneori, cînd infecția este de mai lungă durată se lizează și ligamentele articulare ajungîndu-se la desprinderea razelor osoase. Deseori, cînd activitatea histolitică progresează antero — ventral, se produc eventrații.

ORDINUL ACTINOMYCETALES

FAMILIA MYCOBACTERIACEAE

Genul Mycobacterium

Specii: M. tuberculosis, M. bovis, M. avium, M. microti (M. muris).

Nume comune: bacilul tuberculozei, bacilul lui Koch, B. K.

Gazda receptivă şi infecţia naturală: bacilul tuberculozei este patogen pentru om şi animale. Conform clasificărilor anterioare se considera că există o singură specie *M. tuberculosis* cu trei tipuri sau variante: *var. hominis, var. bovis, var. avium.* Conform clasificării din manualul Bergey (1957) se deosebesc patru specii de bacili ai tuberculozei.

1. *M. tuberculosis* — patogen pentru om, dar poate infecta în condiţii naturale şi alte specii: maimuţa, cîinele, papagalul.

2. *M. bovis* — patogen pentru bovine, dar patogen şi pentru om, cît şi pentru alte specii de mamifere (cal, oaie, capră, porc, pisică, diverse specii sălbatice).

3. *M. avium* — patogen pentru păsări, poate provoca leziuni cazeoase la porc, iepure şi în mod excepţional la om.

4. *M. microti* — agentul tuberculozei şoarecilor de cîmp (*Microtis agrestis*) este nepatogen pentru om.

Surse de izolare: fragmente de organe cu leziuni, spută, secreţii, probe de lapte, fecale, urină etc.

Examen microscopic direct: frotiurile din leziuni nodulare se execută prin strivirea între două lame a unui fragment de caseum. Pentru diagnosticul curent frotiurile se colorează prin metoda Ziehl-Neelsen (vezi pag. 222).

Fiind acido-rezistent, la examenul microscopic bacilul apare colorat în roşu pe fond albastru. În leziunile tuberculoase ale păsărilor, bacteriile se găsesc obişnuit în număr mare în frotiurile directe. În leziunile de la bovine cît şi în alte produse (de ex. lapte, urină etc.), germenii pot fi în număr redus şi nu se găsesc la examenul microscopic al frotiurilor executate prin metode obişnuite (materiale paucibacilare). În acest caz se recurge la metode de îmbogăţire. Ca metode de îmbogăţire se pot folosi următoarele:

— Centrifugarea — se practică pentru examenul laptelui şi urinei. În cazul probelor de lapte, se centrifughează 40—50 ml şi frotiurile se execută apoi din depozitul de centrifugare. În cazul probelor de urină, se centrifughează 100—200 ml (eventual după adăugarea prealabilă a 1—5 ml alcool 50% pentru modificarea densităţii), timp de cel puţin o oră la 1 000 turaţii/minut.

— Omogenizarea cu hidrat de sodiu — la un volum de produs (spută) se adaugă 1—8 volume hidrat de sodiu 6%, se agită bine şi se incubează la 37°C pînă se obţine un aspect omogen al amestecului. Se centrifughează 30 minute la 3 000 turaţii/minut, se spală de două ori cu ser fiziologic, apoi se fac frotiuri din depozit.

— Metoda flotaţiei — dă rezultate în cazul probelor de lapte şi spută. Pentru examenul laptelui se procedează astfel: într-un balon se introduc 50 ml lapte şi 50 ml soluţie 0,6% hidrat de potasiu. Se omogenizează bine şi se introduce într-o baie de apă pentru 30 minute la 50—60°C. Se adaugă apoi 0,5 ml xilol, 60—80 ml apă distilată, se agită bine şi se trece conţinutul într-o sticlă cu gît îngust. Se lasă în repaus 45—60 minute la temperatura camerei. Între timp, se formează un inel cremos la suprafaţă, în care se găsesc bacilii existenţi eventual în lapte; aceştia sînt antrenaţi de xilolul care se ridică la suprafaţă.

— Metoda microculturilor pe lamă — frotiurile se execută prin etalarea materialului (spută, puroi etc.) pe lame înguste (lame obișnuite tăiate în două, în lungime). Se usucă și se introduc pentru 6—7 minute într-o soluție 6% de acid sulfuric, pentru a distruge flora de asociație. Apoi, se trec prin două băi cu apă distilată sterilă, fără a agita lamele în baia de apă și se introduc într-un tub care conține un mediu de cultură lichid (Sauton sau altul). Se incubează la 37°C timp de 7 zile, apoi se scot, se fixează și se colorează cu metoda Ziehl-Neelsen. Rezultatul examenului este pozitiv cînd în cîmpul microscopic se observă microcolonii (grămezi de bacili acidorezistenți).

Condiții de cultivare și conduita de izolare: germen aerob; temperatura optimă de dezvoltare este 37°C; bacilii aviari se dezvoltă bine la temperaturi între 25—45°C. Tulpinile umane și bovine necesită condiții diferite de pH; pentru tulpinile umane pH optim este 7,4—8, pentru cele bovine 5,8—6,9; tulpinile aviare preferă pH ușor alcalin.

Bacilul tuberculozei se cultivă pe medii speciale: medii cu ou (Löwenstein-Jensen, Petrof, Petragnani etc.), medii cu glicerină (cartof glicerinat, bulion glicerinat), diferite medii sintetice etc. (vezi pag. 238).

În diagnosticul curent, pentru izolarea bacilului tuberculozei se folosesc mai ales medii solide cu ovalbumină (Löwenstein-Jensen). Mediile lichide nu oferă condiții favorabile dezvoltării bacteriei în momentul izolării; de aceea se folosesc numai pentru cultivarea tulpinilor de colecție sau pentru prepararea tuberculinei.

Însămînțarea se face obișnuit după o prealabilă omogenizare și fluidificare a materialului și eliminarea concomitentă a florei de asociație.

În acest scop, materialul se tratează cu soluții de acid sulfuric sau hidroxid de sodiu, în anumite concentrații care distrug bacteriile de asociație, dar sînt inactive față de

bacilul tuberculozei. Unele din metodele care se bazează pe acest principiu, cu care se obţin rezultate bune sînt:

— Metoda Saenz Costil — se triturează într-un mojar steril 1—2 g din materialul de examinat, se adaugă 2—3 ml soluţie 15% acid sulfuric sterilizat în prealabil şi se lasă la temperatura camerei timp de 15—20 minute. Se neutralizează apoi adăugîndu-se treptat din soluţia 30% hidroxid de sodiu sterilă, în prezenţa tincturii de turnesol, ca indicator. Imediat după neutralizare se însămînţează pe medii cu ou, cîte 10—15 picături pentru un tub.

— Metoda Petroff — materialul de examinat se amestecă în părţi egale cu o soluţie 4% hidroxid de sodiu. Se lasă 30 minute la 37°C, se centrifughează şi la depozitul obţinut se adaugă cîteva picături de acid clorhidric; se însămînţează în mai multe tuburi.

— Metoda Targnet (considerată ca fiind cea mai bună de către Uniunea Internaţională de Tuberculoză din 1966) — la 2 ml produs se adaugă 3 ml soluţie apoasă de lauryl sulfat de sodiu cu hidroxid de sodiu 1%. Amestecul se centrifughează 30 minute şi depozitul se neutralizează pînă se colorează în galben cu următorul amestec sterilizat prin autoclavare: 1,5 ml acid fosforic şi 2 ml bromcrezol purpur 1/250 la 1 000 ml apă distilată. După neutralizare, se centrifughează din nou şi apoi se însămînţează cîte patru tuburi de mediu cu ou pentru o probă.

Pentru izolarea bacilului tuberculozei din lapte se poate proceda astfel:

— Se centrifughează 50 ml lapte timp de 30 minute la 3 000 turaţii/minut. Depozitul obţinut se tratează cu un volum egal din soluţia N/10 de hidroxid de sodiu şi cîteva picături de tinctură de turnesol. Se omogenizează bine, se lasă 30 minute la 37°C, apoi se neutralizează cu soluţie N/10 de acid clorhidric. Se centrifughează din nou şi din depozitul obţinut se pot face frotiuri şi însămînţări (10—15 tuburi pentru o probă).

Tuburile însămînţate (indiferent de metoda folosită) se închid astfel ca să se împiedice evaporarea apei în cursul incubării, care durează cel puţin două săptămîni pînă la 70 zile. Pentru aceasta dopurile de vată se trec prin flacără astfel ca să se ardă puţin, se înfundă cu o pensă şi se acoperă cu o bandă de leucoplast şi un strat de parafină sau cu un al doilea dop de plută sau cauciuc etc.

Timpul de dezvoltare variază în funcţie de specie: tulpinile aviare, tulpinile umane şi tulpinile murine se dezvoltă în general în 3—4 săpătmîni, în timp ce tulpinile bovine se dezvoltă încet, în 30—70 zile.

Viabilitatea bacililor în culturi este destul de mare — tulpinile aviare pînă la 6 luni—1 an menţinute la 37°C, iar iar cele bovine şi umane cîteva luni; pentru întreţinerea în laborator se recomandă însă trecerea pe medii proaspete a tulpinilor lunar.

Identificare

Morfologie: bacil fin, de 0,5—4 microni lungime şi 0,3—0,6 microni grosime, drept sau uşor încurbat. La tulpinile bovine, bacilii sînt mai scurţi şi mai groşi, la tulpinile aviare se remarcă un polimorfism accentuat de la forme cocoide la forme bacilare, chiar filamentoase. În frotiuri din depozitul cît şi de pe suprafaţa mediilor lichide se pot observa uneori forme filamentoase dispuse paralel în pachete sub forma unor şuviţe de păr.

Este Gram pozitiv; se colorează prin această metodă numai dacă în timpul colorării violetul de genţiana de pe lamă se încălzeşte, pînă la apariţia vaporilor. În diagnosticul curent, nu se foloseşte însă metoda Gram, ci metoda Ziehl-Neelsen, care evidenţiază acidorezistenţa, proprietate care reprezintă un preţios criteriu taxonomic pentru genul *Mycobacterium*.

Caracterele culturale variază în funcţie de specia de *M. tuberculosis* (îndeosebi în momentul izolării), dar şi în funcţie de mediul de cultură.

Pe medii solide, în momentul izolării speciile din genul *Mycobacterium* se dezvoltă formînd colonii de tip S sau tip R. Culturile de tip S au suprafaţa netedă şi lucioasă, sînt relativ uşor omogenizabile, în timp ce culturile de tip R sînt uscate, convexe, cu suprafaţa granulară, neregulate, neomogenizabile.

Aspectul cultural la izolare pe anumite medii solide (Löwenstein) poate servi drept un criteriu orientativ pentru diferenţierea speciilor astfel:

— *M. tuberculosis* formează de la început o cultură de tip R, pigmentată crem sau roz, iar la *M. bovis* şi *M. avium* tipul cultural la izolare este S. Prin mai multe treceri pe medii de cultură şi aceste două tipuri disociază şi se transformă în tipul R.

În cazul cultivării în medii lichide a tulpinilor deja adaptate se pot întîlni diferite aspecte, dintre care cele mai frecvente sînt:

— mediul limpede cu membrană încreţită şi groasă, iar în culturi vechi depozit granular provenit din fragmentarea membranelor desprinse de la suprafaţă şi căzute (de ex., tulpinile umane în bulion glicerinat);

— mediul limpede cu o peliculă vîscoasă, iar în culturi vechi formaţiuni cu aspect de stalactite ce se desprind de la suprafaţă şi ajung pînă la fundul recipientului unde formează un depozit vîscos;

— mediul tulbure cu depozit vîscos — granular (de ex., tulpinile aviare în bulion glicerinat).

Proprietăţi biochimice: tulpinile umane fermentează obişnuit glucoza, arabinoza, galactoza, levuloza, reduc nitraţii şi produc cantităţi însemnate de acid nicotinic (testul lui Konno la niacină este pozitiv), posedă catalază, peroxidază, urează, lipază.

Glicerina stimulează creşterea tulpinilor umane şi aviare, dar întîrzie dezvoltarea tulpinilor bovine şi murine (obişnuit nu se adaugă glicerină la medii pentru cultivarea acestora).

Rezistenţa: este foarte rezistent la uscăciune, supravieţuieşte timp îndelungat în expectoraţii uscate, rezistă luni de zile la putrefacţie. Este sensibil la lumină şi căldură. Temperatura de 60°C omoară bacilul în 40 minute şi cea de 80°C în 5 minute.

Datorită învelişului de natură lipidică, este mai rezistent faţă de acţiunea factorilor fizici şi chimici în comparaţie cu alte specii nesporulate. Acizii şi bazele chiar în concentraţii mari — 10—40% acid sulfuric, 4% hidroxid de potasiu — sînt inactivi.

Formolul 0,01% şi sublimatul 1/1 000 distrug bacilii în 24 ore, fenolul 0,5% în 30 secunde, alcoolul absolut în 5 minute, eterul tot în 5 minute. Este sensibil la anumite antibiotice şi chimioterapice ca: streptomicina, hidrazida acidului izonicotinic (INH), acidul paraaminosalicilic (PAS).

Proprietăţi antigenice: tulpinile umane, bovine, aviare nu se pot diferenţia prin reacţia de aglutinare datorită antigenilor comuni existenţi. Prin reacţia de adsorbţie a aglutininelor se pot diferenţia tulpinile mamifere de cele aviare. Prin reacţia de tuberculinare încrucişată, tulpinile bovine. umane şi murine s-au dovedit a fi apropiate antigenic.

Patogenitatea: se datoreşte toxicităţii şi virulenţei. În condiţii experimentale, bacilul tuberculozei este patogen pentru animale de laborator, dar sensibilitatea acestora variază în funcţie de tipul infectant.

Diferenţierea speciilor de *M. tuberculosis* se poate face prin inoculări la cobai, iepure, păsări, şoarece.

La cobai, inocularea se face obişnuit pe cale subcutană şi primul simptom caracteristic care apare uneori în 5—10 zile este adenita ganglionilor aferenţi locului de inoculare.

Ulterior, se formează un abces rece la locul de inoculare, care poate abceda și ulcerul format persistă pînă la moartea animalului, care survine după 35—60—100 zile de la inoculare. La autopsie, se observă constant plăci necrotice patognomonice în ficat și splină (care este mărită de mai multe ori în volum). Pulmonul poate să nu aibă leziuni sau conține noduli miliari. Alte organe pot prezenta de la caz la caz leziuni. Cobaii infectați reacționează la tuberculină. Cobaiul este egal de sensibil față de tulpini umane și bovine, rezistent față de cele aviare.

Iepurele poate fi infectat cu toate speciile însă reacția este diferită; este foarte sensibil față de *M bovis* și mai rezistent față de celelalte specii. Tulpinile bovine inoculate intravenos în doză de 10^{-4} mg — 1 mg bacili greu tate umedă provoacă o tuberculoză evolutivă (animalele mor pînă la 60 zile). Leziunile produse de bacilii bovini la iepure sînt caracteristice. Spre deosebire de cobai, organul cel mai frecvent afectat este pulmonul și în mai rare cazuri organele din cavitatea peritoneală (ficatul, splina, rinichiul, intestinul etc.). De asemenea, diferă și tipul de leziune. În timp ce la cobai predomină plăcile necrotice, pentru iepure este caracteristică leziunea nodulară. Tulpinile aviare sînt patogene pentru iepure în doze mari (1,5—10 mg) și produc o tuberculoză septicemică de tip Yersin (animalele mor în 2—3 săptămîni, deseori fără leziuni macroscopice evidente, dar cu un număr mare de bacili în frotiuri). Tulpinile umane infectează greu iepurele și produc numai leziuni decelabile histologic.

Practic, pentru diferențierea tulpinilor umane de cele bovine se inoculează doi iepuri intravenos cu 1 mg și doi cu 0,01 mg; dacă tulpinile sînt bovine animalele mor pînă la 60 zile, dacă tulpinile sînt umane nu mor decît foarte rar pînă la 60 zile și animalele moarte sau sacrifi-

cate în general nu prezintă leziuni evidente (Stamatin, 1957).

Păsările sînt rezistente față de tulpinile umane și bovine; tulpinile aviare, în schimb, inoculate intravenos în doze de 0,1 mg produc o tuberculoză septicemică tip Yersin, iar în doze mai mici o tuberculoză subacută cu leziuni nodulare în organe, foarte bogate în bacili. Stamatin și Stamatin (1939) au stabilit patogenitatea experimentală a diferitelor tipuri de bacili pentru șoarece, care este la fel de sensibil față de tulpinile umane și bovine. Șoarecele inoculat intravenos cu 1—2 mg bacili face în 2—6 săptămîni o infecție predominant pulmonară și cu leziuni mai discrete, dar foarte bogate în bacili, localizate în splină și ficat. Șoarecele mai este sensibil și față de tipul murin, dar se infectează mai greu cu tulpinile aviare.

Conduita diagnosticului de laborator al tuberculozei.

I. Punerea în evidență și izolarea bacteriei.

— Examenul microscopic al frotiurilor directe sau după tratarea materialului prin diferite metode de îmbogățire și colorate cu metoda Ziehl-Neelsen.

— Izolarea prin însămînțări pe medii cu ou, după tratarea materialului pentru distrugerea florei de asociație.

II. Identificarea speciei prin:

— examenul caracterelor morfologice în frotiuri colorate cu metoda Ziehl-Neelsen;

— timpul de dezvoltare al culturilor;

— examenul caracterelor culturale la izolare pe medii solide;

— infecția experimentală pe cobai, iepure, păsări, șoarece (tabelul 23).

Pentru diferențierea speciilor *M. tuberculosis* și *M. bovis* se pot utiliza și o serie de teste de culoare, în care tulpinile se comportă diferit. Dintre acestea, cel mai utilizat este testul Konno sau al niacinei (Săvulescu, 1969). Prin testul niacinei se pune în evidență proprieta-

TABELUL 23

Caracterele diferenţiale între speciile bacilului tuberculozei

	Morfologie	Caractere culturale la izolare		Patogenitate			
		Tip cultural	Timp de dezvoltare	Cobai	Iepure	Păsări	Şoarece
M. tuberculosis	bacil fin, subţire	R pigmentat	15—30 zile	+	∓	—	±
M. bovis	bacil mai scurt şi gros	S	30—75 zile	+	+	—	+
M. avium	polimorfism accentuat	S	9—15 zile	—	+	+	∓
M. microti	bacil lung subţire, uneori formă cocoidă	R	30—40 zile	—	—	—	+

Legendă: + = tuberculoză generalizată; — = rezistent; ∓ = tuberculoză neevolutivă, rar mortală.

tea de a sintetiza acidul nicotinic de către micobacterii, proprietate care este mai evidentă la *M. tuberculosis* şi foarte redusă sau inexistentă la *M. bovis*.

Specia M. paratuberculosis (Bacillus paratuberculosis)

Numele comun: bacilul enteritei hipertrofiante sau al paratuberculozei bivideelor; bacilul lui Johne.

Gazda receptivă şi infecţia naturală: M. paratuberculosis produce dizenteria cronică bacilară sau enterita hipertrofiantă denumită şi boala lui Johne mai frecventă la

bovine, dar s-a descris și la bubaline, ovine, caprine, cămile.

Surse de izolare: materii fecale de la animalele bolnave, mucoasa intestinală.

Examen microscopic direct: în frotiuri din porțiunile de mucoasă eliminate prin materii fecale sau recoltate din rect, colorate cu metoda Ziehl-Neelsen se observă grămezi de bacili scurți acido-rezistenți.

Condiții de cultivare și izolare: aerob; temperatura optimă de dezvoltare este 39°C, limitele fiind între 28°C, și 43°C, iar pH optim este 6,6.

Se cultivă greu și pe aceleași medii ca și bacilii tuberculozei; creșterea este favorizată prin adăugarea de extracte din alți bacili acidorezistenți (obișnuit se folosește extract din *M. phlei*). Pe medii lichide, cultura apare după 3—4 săptămîni; pe medii solide (Dorset, Löwenstein) după 1—2 luni.

Pentru izolare din ganglioni, unde nu există o floră secundară, însămînțarea se face direct din materialul recoltat cu pipeta.

Pentru izolarea din material cu floră secundară, cum este intestinul, acesta se poate prelucra în prealabil prin metoda Saenz Costil sau prin metoda următoare: un fragment de intestin cu leziuni caracteristice se spală, se triturează cu nisip într-un mojar, se adaugă 8—10 volume soluție 0,4% de NaOH și se lasă 3 ore la etuvă. Amestecul se centrifughează, se neutralizează și se însămînțează.

Identificare

Morfologie: bacil scurt de 1—2 microni lungime, colorat uniform cu metoda Ziehl-Neelsen, este acido-rezistent; imobil, nesporulat, necapsulat.

Caractere culturale: medii lichide — în 3—4 săptămîni membrană albă, subţire, încreţită; medii solide — colonii vizibile după 1—2 luni; la început sînt rotunde, bombate, neaderente; prin învechire, în jurul lor se constituie o membrană albă, uscată care se întinde pe toată suprafaţa mediului. În culturi este viabil 4—5 luni la 37°C.

Rezistenţa: se comportă faţă de factorii de mediu la fel ca bacilul tuberculozei.

Patogenitate: bacilul nu secretă toxine. În condiţii experimentale, nu este patogen pentru cobai şi iepure. Infecţia se reproduce greu şi numai prin inoculare intravenoasă la speciile natural receptive (bou, oaie, capră).

FAMILIA ACTINOMYCETACEAE

Genul Actinomyces

Specia A. bovis

Gazda receptivă şi infecţia naturală: produce actinomicoza osoasă a taurinelor; infecţiile la alte specii au un caracter accidental şi sînt foarte rare.

Surse de izolare: materialul purulent din leziuni.

Examen microscopic: la examenul între lamă şi lamelă al puroiului se observă tufe actinomicotice, care au aspectul unor mase neregulate, circumscrise de o coroană de formaţiuni filamentoase, terminate la extremităţi cu cîte o măciucă. În frotiurile colorate prin metoda Gram sînt prezenţi germeni subţiri Gram pozitivi de formă bacilară şi filamentoasă. Filamentele pot prezenta ramificaţii. În rare cazuri la extremitatea unor filamente se observă dilataţii asemănătoare cu măciucile, constant evidente la examenul între lamă şi lamelă.

Condiţii de cultivare: anaerob la izolare, după adaptare prin treceri pe mai multe medii de cultură devine microaerofil. Nu creşte în bulion şi pe agar; necesită medii cu ser şi glucoză sau tioglicolat. Se dezvoltă în 48—72 ore.

Identificare

Morfologie: germen polimorf, prezentînd aspecte foarte diferite în funcţie de materialul din care se face examenul microscopic. În frotiurile din leziuni predomină formele filamentoase, deseori ramificate şi cu extremităţile uneori măciucate. În frotiurile din culturi predomină formele bacilare, asemănătoare ca aspect cu germenii din genul *Corynebacterium*. Este un germen fin, diametrul transversal fiind de aproximativ 0,2—0,5 microni. Este necapsulat, neciliat, nesporulat. Gram pozitiv, neacido-rezistent.

Caractere culturale: diferă în funcţie de mediul pe care se cultivă: pe suprafaţa mediilor solide formează colonii de culoare gălbuie, de regulă de tip S (suprafaţa netedă, margini regulate, neaderente); în profunzimea mediilor semisolide se obţin colonii sferoidale cu periferia mai mult sau mai puţin regulată de dimensiuni variabile (1—3 mm diametru), opace. În medii lichide produce o turbiditate moderată şi un depozit în majoritatea cazurilor granular.

Proprietăţi biochimice: majoritatea tulpinilor fermentează glucoza, lactoza, zaharoza şi maltoza. Nu produce indol, nici H_2S. Este nehemolitic şi neproteolitic. Produce NH_3, reduce nitraţii, acidifică laptele turnesolat fără să-l coaguleze. Obişnuit, nu se recurge la examenul biochimic pentru identificarea acestui germen.

Patogenitate: mecanismele patogenităţii nu sînt demonstrate. Practic nepatogen pentru animalele de laborator.

Proprietăţi antigenice: pentru diagnosticul infecţiei naturale Linsert şi col. (1970) recomandă ca metodă serologică RFC, după cum şi un test alergic prin injectarea intracutanată a 0,1 ml antigen actinomicotic.

Specia A. israelli

În această specie sînt încadrate tulpinile de *Actinomyces* izolate din infecţiile actinomicotice ale omului. După unii autori, *A. israelii* nu este considerat ca o specie aparte, ci numai o variantă a speciei *A. bovis*. Totuşi, există argumente care pot pleda şi în favoarea acceptării a două specii separate.

TABELUL 24

Caractere diferenţiale între A. bovis şi A. israelii

Caracterul diferenţial	Specia (tipul)	
	A. bovis (tipul bovin)	*A. israelii* (tipul uman)
Gazda receptivă	Taurinele	Omul
Localizarea	Osoasă	În ţesuturi moi
Gradul de anaerobioză	Anaerob la izolare; se adaptează uşor la condiţii microaerofile şi chiar aerobe	Anaerob; de regulă nu se adaptează la condiţii microaerofile
Tipul cultural	S	R
Timpul de dezvoltare pe medii de cultură	Mai scurt	Mai lung
Capacitatea fermentativă faţă de glucide şi polialcooli	Mai mică	Mai mare
Structura antigenică	Distinctă	

Genul Nocardia

Specia N. asteroides

Gazde receptive şi infecţii naturale: nocardiozele sînt infecţii care pot îmbrăca aspecte anatomo-clinice variate şi pot fi întîlnite la om şi diverse specii animale. Mai frecvente sînt nocardiozele carnasierelor, apoi mamitele nocardice ale taurinelor (mai răspîndite în nord-vestul Europei). În ţara noastră au fost izolate tulpini de *Nocardia* de la om, din diferite mixoedeme ale membrelor inferioare, din infecţii pulmonare (Rusu şi col., 1970), iar de la animale dintr-un caz de peritonită de la un cîine (Carol-Dumitriu, 1971).

Surse de izolare: material purulent din leziuni, lapte etc.

Examenul microscopic direct: în frotiurile din puroi sau din depozitul de centrifugare al probelor de lapte provenite din cazuri de mamită nocardică sînt prezenţi germeni de regulă filamentoşi uneori ramificaţi, Gram pozitivi, acido-rezistenţi.

Condiţii de cultivare: aerob, se dezvoltă pe medii uzuale, dar la izolare este mai adecvată folosirea agarului cu sînge sau cu ser. Se dezvoltă în 3—7 zile la 22°C. Temperatura de 37°C este mai puţin favorabilă dezvoltării nocardiilor. Supravieţuieşte în culturi mai multe luni.

Identificare

Morfologie. Germen polimorf; cel mai frecvent se întîlnesc formele filamentoase subţiri, uneori ramificate, neciliat, necapsulat, nesporulat, Gram pozitiv, acido-rezistent. Pentru punerea în evidenţă a acidorezistenţei nocardiilor, se folosesc variante ale metodei de colorare Ziehl-Neelsen, care se deosebesc de metoda clasică prin folosirea pentru

decolorare a unor soluţii mai puţin concentrate de acizi (vezi pag. 224).

Caractere culturale: pe suprafaţa mediilor solide formează colonii foarte variate ca aspect. Mărimea coloniilor este neuniformă, sînt perfect opace şi de tip R. Au suprafaţa mată şi aspră; culoarea lor obişnuită este albă-cretacee, dar pot fi uneori şi pigmentate. Deseori, coloniile au neregularităţi pe suprafaţă, simetrice sau asimetrice. Aderenţa coloniilor de mediu este variabilă. În medii lichide formează la suprafaţă pelicule groase, încreţite.

Proprietăţi biochimice şi biologice generale: pentru diferenţierea speciei *N. asteroides* de alte specii de *Nocardia* se foloseşte un mare număr de teste, unele din ele diferite de testele clasice din bacteriologie. Dintre acestea menţionăm rezistenţa la descompunere sub acţiunea nocardiilor a cazeinei, tirozinei, xantinei etc. (tabelul 25). *N. asteroides* fermentează glucoza şi esculina, are o comportare variabilă faţă de ramnoză, galactoză şi amidon, produce catalază, reduce nitraţii şi unele tulpini pot folosi citraţii ca unică sursă de carbon. Descompune ureea, este rezistentă la lizozim şi la încălzire timp de 4 ore la 60°C.

Patogenitate: şoarecele şi cobaiul sînt sensibili la infecţia experimentală; calea cea mai severă este cea intraperitoneală. Boala evoluează cronic, nu totdeauna mortal, iar leziunile caracteristice sînt abcesele şi adenitele hipertrofice.

Taxonomie: din genul *Nocardia* fac parte 45 specii (Bergey, 1957). O parte din ele pot fi izolate de la animale şi diferenţierea între ele, după cum şi diferenţierea lor de *N. asteroides* este deseori foarte dificilă (tabelul 25).

TABELUL 25

Diferenţierea unor specii din genul Nocardia, care se izolează de la animale, pe baza proprietăţilor fiziologice
(după G o r d o n, modificat de R u s u şi col., 1970)

Caractere fiziologice diferenţiale		*N. asteroides*	*N. caviae*	*N. brasiliensis*	*N. madurae*	*N. pelletieri*	*N. dasson villei*	Genul *Streptomyces*
Acidorezistenţa		v	v	v	—	—	—	—
Caractere metabolice generale	Catalaza	+	+	+	+	+	+	+
	Oxidaza	—	—	—	—	—	—	—
	Desfacerea oxidativă a glucozei	+	+	+	+	+	+	v
	Reducerea nitraţilor	+	+	+	+	+	+	v
Rezistenţa la descompunere a:	Cazeina	—	—	+	+	+	+	+
	Tirozina	—	—	+	+	+	+	+
	Xantina	—	+	—	—	—	+	v
	Ureea	+	+	+	—	—	v	v
Rezistenţa faţă de:	60°C—4 ore	+	+	—	+	+	+	+
	Lizozim	+	+	+	—	—	—	—
Fermentarea:	Ramnoza	v	—	—	+	—	v	—
	Xiloza	—	—	—	+	—	+	v
	Arabinoza	—	—	—	+	—	v	v
	Glucoza	+	+	+	+	+	+	+
	Galactoza	v	—	+	+	—	v	+
	Lactoza	—	—	—	v	—	—	v
	Maltoza	—	—	—	v	—	+	+
	Trehaloza	—	—	+	+	v	v	+

Caractere fiziologice diferențiale		*N. asteroides*	*N. caviae*	*N. brasiliensis*	*N. madurae*	*N. pelletieri*	*N. dassonvillei*	Genul *Streptomyces*
	Rafinoza	—	—	—	—	—	—	—
	Manitolul	—	+	+	+	—	+	v
	Adonitolul	—	—	—	+	—	—	v
	Sorbitolul	—	—	—	—	—	—	—
	Inozitolul	—	+	+	v	—	—	—
Hidroliza	Esculina	+	+	+	+	—	—	—
	Amidonul	v	v	v	+	—	+	v
Utilizarea de acizi organici	Citratul	v	v	+	+	—	+	v

Legendă: + = caracter pozitiv; — = caracter negativ; v = caracter variabil

ORDINUL SPIROCHAETALES

FAMILIA TREPONEMATACEAE

Genul Borrelia

Specia B. anserina (Spirochaeta anserina, Sp. gallinarum)

Gazde receptive și infecția naturală: produce spirochetoza la păsări, între care se transmite direct prin căpușile din genurile *Argas* și *Ornitodorus*.

Surse de izolare: sînge recoltat de la păsări în faza febrilă; sînge și organe de la cadavrele infectate; căpușe.

Examenul microscopic direct: este concludent în majoritatea cazurilor pentru diagnosticul infecțiilor produse de

B. anserina. Din sîngele păsărilor bolnave se fac frotiuri după tehnica folosită pentru examenul sîngelui, care se colorează prin metoda May-Grümwald-Giemsa. Spirochetele apar sub formă de filamente subţiri spiralate, colorate în roz pal, dispuse printre elementele figurate ale sîngelui. Spirochetele sînt evidenţiabile microscopic şi în frotiurile executate din triturate de căpuşe, sub formă de elemente granulare cu diametrul de 0,1—0,3 microni, care sînt considerate de unii autori ca forme metaciclice de rezistenţă şi latenţă a germenului (după Simionescu, 1970).

Condiţii de cultivare şi izolare: anaerob, se cultivă numai pe medii speciale bogate în proteină. Simionescu (1970) a cultivat germenii prin metoda propusă de Ungermann, Galloway şi Johnel (1933), care are următoarea conduită: se pregăteşte un substrat, repartizînd în eprubete o cantitate de albuş de ou care se coagulează în poziţie înclinată, apoi se adaugă 5 ml ser de cal lichid şi diluat 1/5 sau ser de iepure diluat 1/5. După adăugarea unuia din cele 2 seruri mediile se inactivează timp de 1 oră la 56°C. Apoi se însămînţează, iar după însămînţare se adaugă un strat fin de parafină sterilă. Incubarea se face la 30—32°C, timp de mai multe zile. În vederea adaptării germenului pe medii de cultură se impun mai multe treceri, mai întîi la intervale de 4 zile, după care pasajele trebuie făcute din 2 în 2 zile; pH optim este 7,2—7,6.

O altă metodă de cultivare prin care se obţin rezultate mult mai bune decît în cazul mediilor inerte este cultivarea pe embrion de găină. Se recomandă însămînţarea pe membrana corio-alantoidiană la embrioni de 12—14 zile. Fiecare embrion se inoculează cu 0,2 ml sînge. Infecţia evoluează într-un interval de 5—8 zile, cînd embrionii mor.

Morfologie: microorganism filiform, de 8—15 microni lungime şi 0,25—0,3 microni diametru transversal, spiralat, avînd un număr de 8—15 spirale rigide. Amplitudinea unei spirale este de 1 micron. Este neciliat şi nesporulat. Mobilitatea accentuată nu se datoreşte unui aparat ciliar, ci mişcărilor ondulatorii şi de rotaţie ale corpului microbian. Nu se colorează prin metoda Gram.

Caractere culturale: întrucît în practică nu se recurge curent la cultivarea germenului, nu prezintă importanţă pentru identificare.

Examene serologice: rezultate bune se obţin prin imunofluorescenţă. Totodată, în serul găinilor bolnave apare o proteină specifică din grupul β -globulinelor strîns legată de infecţia cu spirochete evidenţiabilă prin imunoelectroforeză (Simionescu, 1970). Alte reacţii posibile pentru detectarea anticorpilor antispirochetici sînt aglutinarea lentă şi o reacţie de tip Pfeiffer, care constă în inocularea intraperitoneală la şoarece a serului de examinat şi a 0,2 ml sînge conţinînd borelii. În cazul reacţiei pozitive, după o oră de la inoculare, în frotiurile din exsudatul peritoneal se observă spirochetele în diferite stadii de liză.

Patogenitatea experimentală poate fi reprodusă pe găini sau pe şoareci sugari prin inoculare de suspensii de organe (diluţie 1/10 în ser fiziologic). La găini, se inoculează cîte 2 ml intramuscular sau 1 ml intraperitoneal, iar la şoareci 0,2—0,5 ml intraperitoneal. În cazul unei infecţii evolutive la 48—72 ore, la examenul microscopic al sîngelui sînt evidenţiabile spirochetele. Păsările mor de regulă la 48—72 ore (Linsert şi col., 1970).

Genul Leptospira

Gazde receptive şi infecţia naturală: leptospirozele sînt infecţii comune omului şi unui număr mare de specii animale (suine, cabaline, taurine, carnasiere etc.). În natură, se găseşte un număr mare de tulpini de leptospire nepatogene a căror nişă ecologică este de regulă apa.

Surse de izolare: sînge şi diferite organe de la animalele infectate (rinichi, ficat, splină), lichide din diverse cavităţi (lichid peritoneal, pericardic, umorile ochiului), avortoni, purcei nou-născuţi, urină. Dintre mediile naturale, sursa obişnuită de izolare este apa. Materialele patologice trebuie să fie proaspăt recoltate, datorită faptului că leptospirele se lizează în organismul gazdă într-un timp relativ scurt de la moarte.

Examenul microscopic direct este rareori concludent. Metodele care pot fi recomandate sînt: examenul materialelor lichide între lamă şi lamelă, în cîmp întunecat, imunofluorescenţa sau frotiuri colorate prin metode speciale (Burri, Levaditi).

Condiţii de cultivare: aerob; se cultivă pe medii speciale, cel mai frecvent folosit fiind mediul Korthov (vezi pag. 250). Temperatura optimă de dezvoltare este de 25—30°C. Întrucît leptospirele nu produc modificări vizibile ale mediilor în care se multiplică, culturile trebuie examinate microscopic în cîmp întunecat, din 2 în 2 zile. În vederea izolării tulpinilor, se impun uneori mai multe treceri oarbe la interval de 4—5 zile.

Identificare

Morfologie: la examenul în cîmp întunecat între lamă şi lamelă leptospirele apar sub formă de filamente foarte fine ale căror spirale primare abia pot fi intuite; mobile, în timpul mişcărilor luînd naştere spiralele secundare (fi-

lamentele iau forma literelor C, S etc.). Examenul leptospirelor în frotiuri colorate se practică mai mult în şcoli şi facultăţi pentru scopuri didactice. Colorate prin metoda Fontana-Tribondeau (vezi pag. 225) leptospirele apar sub formă de filamente de culoare brună sau neagră, uşor zimţate (zimţăturile reprezintă spiralele primare) şi incurbate în diferite sensuri (spiralele secundare). Structura unei leptospire stabilită prin examene electronooptice este următoarea: corpul este constituit din trei componente (un filament axial, un cilindru citoplasmatic şi o membrană). Lungimea leptospirelor variază între 6 şi 150 microni. Cele patogene sînt în general mici sau mijlocii (6—20 microni). Diametrul transversal al cilindrului citoplasmatic este de 0,06—0,12 microni, iar împreună cu membrana 0,16 microni. Cilindrul citoplasmatic este înfăşurat în spirală în jurul filamentului axial pe care îşi are inserţia rigidă, fapt care determină regularitatea spiralelor primare. Acestea sînt foarte fine avînd o adîncime de 0,3 microni şi 0,4—0,5 microni amplitudine. După N o r u c h i (citat de B e r c e a, 1969) o leptospiră care măsoară 9 microni are 18 spire. La ambele extremităţi, leptospirele sînt prevăzute cu cîte un cîrlig (croşetă). Leptospirele, ca şi borreliile, sînt lipsite de cili. Mobilitatea lor accentuată se realizează prin mişcările de flexiune, rotaţie şi translaţie a corpului bacterian (datorită acestei însuşiri unii autori le încadrează printre protozoare). Sînt lipsite de capsulă şi spor, iar proprietăţile tinctoriale folosite curent pentru diferenţierea bacteriilor — Gram-pozitivitatea, acidorezistenţa — nu interesează în cazul examenului leptospirelor.

Caractere culturale: nu sînt luate în considerare, întrucît leptospirele nu produc modificări evidente sau caracteristice ale mediilor de cultură.

Structura antigenică: subcomitetul de experţi O.M.S. în raportul din 1967 stabileşte 18 grupe serologice de leptospire; în cadrul fiecărui grup se deosebesc mai multe se-

rotipuri; unele serotipuri pot avea subserotipuri. Pentru diferenţierea grupelor şi serotipurilor se foloseşte reacţia de aglutinare-liză (vezi pag. 321).

Rezistenţă: leptospirele sînt sensibile la acţiunea diferiţilor factori de mediu. Cele patogene supravieţuiesc un timp limitat în mediul exterior. Cele nepatogene au chiar posibilitatea de a se multiplica în apă. La 56°C sînt distruse în 10 minute, iar la 65°C în cîteva minute. Antisepticele uzuale le distrug în concentraţii curent folosite. Sînt foarte sensibile la acizi. Pentru dezinfecţiile curente în laboratoarele de leptospiroze se foloseşte acidul acetic care le distruge instantaneu.

Patogenitate: principalul factor al patogenităţii leptospirelor este virulenţa. După unii autori există şi componente toxice cu caracteristici de endotoxine. Între diverse serotipuri şi tulpini există diferenţe privind gradul de patogenitate. Din punct de vedere al tabloului clinic al infecţiilor pe care le produc, leptospirele se împart în icterigene şi anicterigene. Animalul de laborator cel mai sensibil este cobaiul. Chiar în cazurile cînd animalele nu fac infecţii mortale, în serul lor apar anticorpii decelabili prin reacţia de aglutinare-liză. Cobaii se inoculează totdeauna pe cale intraperitoneală, sînt apoi termometraţi zilnic, iar în fazele de hipertermie li se recoltează sînge din cord pentru însămînţări pe medii de cultură. În afară de cobai mai pot fi folosiţi hamsterul, iepurele şi şoarecele. Aceste specii sînt însă mai rezistente, se infectează cu doze mai mari şi de aceea sînt folosite mai rar.

Taxonomie: cu privire la problema speciilor în cadrul genului *Leptospira* există trei teorii sau puncte de vedere:

— teoria unicistă, conform căreia toate leptospirele sînt încadrate într-o singură specie;

— teoria dualistă, conform căreia leptospirele sînt încadrate în două specii: *L. interrogans* care cuprinde tul-

pinile patogene și *L. biflexa* din care fac parte tulpinile nepatogene;

— teoria pluralistă care admite existența mai multor specii de leptospire, adoptînd drept criteriu taxonomic principal pe cel serologic.

Astăzi, este oficial acceptată teoria unicistă, adoptată în 1966 la Congresul Internațional de Microbiologie de la Moscova. Toate leptospirele fac parte dintr-o singură specie — *L. interrogans*, în cadrul căreia se deosebesc grupele și tipurile serologice redate în tabelul 26 (după B e r c e a, 1969).

TABELUL 26

Serotipurile și subserotipurile de leptospire patogene
(după B e r c e a, 1969)

Serogrup	Serotip	Subserotip	Tulpina tip
icterohaemorrhagiae	*icterohaemorrhagiae* (AB)	*icterohaemorrhagiae*	M 20
	icterohaemorrhagiae (A)	*incompleta*	RGA
	naam		Naam
	mankarso		Mankarso
	sarmin		Sarmin
	birkini	*birkini*	Birkin
	birkini	*smithii*	Smith
	ndambari		Ndambari
javanica	*javanica*		Veldrat Batavia 46
	poi		Poi
	Coxi		Cox
canicola	*canicola*		Hond Utrecht IV
	schüffneri		Vleermuis 90 C
	benjamin		Benjamin
	jonsis		Jones
	sumneri		Summer
	malaya		H-6

Serogrup	Serotip	Subserotip	Tulpina tip
ballum	*ballum* *ballum* (AB)	*ballumensis* *castellonis*	Mus 127 Castellon 3
pyrogenes	*pyrogenes* *zanoni-australis(B)* *abramis* *biggis* *hamptoni*		Salinem Zanoni Abraham Biggs Hampton
cynopteri	*cynopteri* *butembo*		3522C Butembo
autumnalis	*autumnalis* (AB) *autumnalis* (A) *bangkinang* *mooris* *sentot* *djasiman*	*autumnalis* *rachmati*	Akiyami A Rachmat Bangkinang I Moores Sentot Djasiman
australis	*australis-australis* A *muenchen* *esposito*		Ballico München C-90 Esposito
pomona	*pomona*		Pomona
grippo-typhosa	*grippotyphosa*		Moskva V
hebdomadis	*hebdomadis* *medanensis* *wolffii* *hardjo* *mini* *mini* *kremastos* *kabura* *jules* *haemolytica* *haemolytica* *worsfoldi* *sejroe*	*mini* *szwajizak* *haemolytica* *ricardi*	Hebdomadis Hond HC 3705 Hardjoprajitno Sari Szwajizak Kremastos Kabura Jules Marsh Richardson Worsfold M 48

Serogrup	Serotip	Subserotip	Tulpina tip
	saxkoebing *borincana*		Mus 24 HS-622
bataviae	*bataviae* *paidjan*		Swart Paidjan
semarang	*semarang*		Veldrat S 173
andaman	*andaman*		CH 11
hyos (sau tara-ssovi)	*hyos-mitis/johnson* *hyos*	*hyos* *bakeri*	Mitis Johnson LT 79
celledoni	*celledoni* *celledoni* (II)	*celledoni* *whitcombi*	Celledoni Whitcomb
Panama	*panama*		CZ 214 k
Shermani	*shermani*		LT 821

ORDINUL MYCOPLASMATALES
FAMILIA MYCOPLASMATACEAE

Genul Mycoplasma

Gazde receptive şi infecţii naturale: micoplasmele produc infecţii primare, secundare şi condiţionate la om şi numeroase specii animale, cele mai importante pentru patologia veterinară fiind micoplasmozele aviare şi cele ale suinelor (tabelul 27).

Surse de izolare: bovine — probe lapte (sediment şi inelul de grăsime după centrifugare), secreţii vaginale, secreţii nazale, fragmente de organe, ganglioni limfatici; porcine — secreţii nazale, fragmente de organe, ganglioni; păsări — fragmente de organe, sistemul nervos central, sinus infraorbital, seroase.

Condiţii de cultivare şi conduita de izolare: în general aerobe, dar există şi specii care la izolare necesită condi-

TABELUL 27

Speciile din genul Mycoplasma, care se izolează de la animale

Specia	Gazda receptivă	Sediul în organism sau infecţia naturală din care se izolează
M. mycoides	Taurine	Peripneumonia contagioasă
M. bovigenitalium	Taurine	Cazuri de sterilitate
M. bovirhinis	Taurine	Epifit al căilor respiratorii; mamite, pneumonii
M. laidlawii	Taurine	Căi genitale şi secreţii nazale
M. agalactiae	Ovine, caprine	Agalaxia contagioasă (răsfugul alb)
M. mycoides var. caprae	Caprine	Pleuropneumonia contagioasă a caprelor
M. hyorhinis	Suine	Poliartrite
M. granularum	Suine	Artrite
M. hyopneumoniae	Suine	Pneumonia enzootică
M. hyogenitalium	Suine	Mamite
M. hyoarthrinosa	Suine	Artrite
M. gallisepticum	Păsări	Micoplasmoza respiratorie aviară (MRA); sinuzita curcanilor
M. meleagridis	Curci	Aerosaculita
M. synoviae	Păsări	Polisinovita infecţioasă
M. spumans *M. canis* *M. maculosum*	Canine	Infecţii secundare în jigodie

ţii de anaerobioză; temperatură optimă este 36—38°C, pH 7,4. Se cultivă pe medii speciale, foarte variate ca mod de preparare şi compoziţie. Ca medii lichide, care corespund şi tulpinilor mai exigente, Drăghici şi Ungureanu (1972) recomandă bulionul şi agarul PPLO (vezi pag. 250, 251). În vederea izolării, însămînţările se fac în cel mai scurt timp după moartea animalelor. Probele se transportă la laborator în termos cu gheaţă sau se introduc imediat după recoltare în medii de transport, cum este mediul Stuart (Csonka, citat Fallon, 1969) şi astfel se expediază la laborator. Izolarea se poate face pe medii acelulare, pe embrion de găină sau pe culturi celulare.

Însămînţarea pe medii acelulare se execută cu pipeta Pasteur introducîndu-se o cantitate mai mare de material recoltat direct din proba de examinat sau din lichidul supernatant obţinut după mojarare. Drăghici şi col. (1972) obţin rezultate bune introducînd în mediu lichid fragmente de organe recoltate steril (1 g la 5 ml mediu). Primele 2—3 transplantări se fac la interval de 6—7 zile, în medii selective, în momentul cînd culoarea mediului virează spre acid. Fiecare pasaj se verifică prin însămînţări pe medii solide în cutii Petri. Timpul de dezvoltare în medii lichide este de 48—72 ore, iar pe medii solide de 6—7 zile. Unele tulpini se dezvoltă bine în simbioză cu o tulpină de stafilococ (fenomenul de satelitism).

În medii lichide, micoplasmele supravieţuiesc în culturi 10—12 zile la temperatura camerei, peste 3 săptămîni la 5°C şi în jur de 3 luni la —20°C, iar liofilizate peste 1 an.

Izolarea pe embrion de găină se realizează prin inoculări a 0,2 ml din suspensie, pe cale intravitelină la embrioni de 6—7 zile. Confirmarea multiplicării pe embrion se face prin reizolarea pe medii solide PPLO.

Pentru izolarea şi cultivarea micoplasmelor în culturi celulare se folosesc în general culturi celulare omoloage

speciei animale de la care se izolează tulpina de *Mycoplasma*. În urma multiplicării, unele tulpini produc efect citopatic, la altele însă multiplicarea nu este urmată de modificări celulare vizibile. Controlul prezenței micoplasmelor în culturi celulare se face prin însămînțări pe agar PPLO.

Identificare

Morfologie: micoplasmele sînt polimorfe, ceea ce s-ar datora în parte faptului că sînt lipsite de perete celular. În frotiuri din medii de cultură, se pot observa forme cocoide (0,3 microni diametru), forme bacilare (0,3—0,6 microni lungime și 0,3 microni grosime), forme filamentoase (40—50 și chiar 150 microni lungime) uneori ramificate. Formele morfologice diferite în culturi ar reprezenta, după cum susțin majoritatea cercetătorilor, diferite etape în ciclul de multiplicare. Se admite că la micoplasme există două tipuri de multiplicare: prin înmugurire și fisiune binară (Drăghici și Unguureanu, 1972). Formele filamentoase apar în cursul multiplicării prin înmugurire și sînt considerate ca etape obligatorii în faza prelogaritmică de dezvoltare la diferite specii de micoplasme. Cu timpul pe traiectul filamentelor apar formațiuni sferice mai intens colorate, denumite corpusculi elementari, care persistă după dispariția filamentelor și predomină în culturi vechi ca forme sferice sau inelare ale micoplasmelor. Micoplasmele nu au cili. Sînt Gram negative, dar metoda Gram este neadecvată, micoplasmele colorîndu-se slab prin această tehnică. S-au propus numeroase metode de colorare; Drăghici și Unguureanu (1972) recomandă metoda Giemsa după următoarea tehnică: frotiul se fixează în fixator Bouin timp de 30 minute; se spală bine cu apă de robinet și se introduce pentru 60 minute în soluție Giemsa proaspăt preparată (3 picături

la 2 ml apă distilată). După colorare, se spală şi se usucă. La examenul microscopic apar forme cocoide, inelare, filamentoase, colorate în albastru.

Caractere culturale: medii lichide — deseori turbiditatea este foarte redusă şi se observă greu; în acest caz, cultivarea se face pe medii care conţin glucoză şi indicator (roşu fenol), iar dezvoltarea se apreciază după modificarea culorii mediului. În cazul cultivării pe medii fără indicator, controlul se face prin transplantare pe medii solide. Medii solide — coloniile fiind mici, aspectul cultural se examinează la lupă sau microscop. La examenul microscopic al culturilor de micoplasme se pot deosebi trei tipuri de colonii:

— colonii tip T (thin) — sînt mici, cu diametrul de 10—20 microni, uşor bombate, rotunde, dense, fără zonă periferică;

— colonii mijlocii, bombate cu centrul granular şi o zonă marginală îngustă, abia vizibilă; după 6 zile de incubare pot ajunge la 100 microni diametru;

— colonii butonate mamelonate — sînt mari, formate din două zone bine delimitate — una centrală opacă, densă şi alta marginală, mai transparentă.

Aspectul morfologic al coloniilor se poate controla prin: 1. examenul la microscopul cu contrast de fază — în acest scop se secţionează cu o lamă de ras un strat subţire de agar cu colonia de examinat, se pune pe lamă, se acoperă şi se presează uşor cu o lamelă, se examinează cu obiectivul 60. Această metodă relevă structura fin-granulară a coloniilor; 2. colorarea cu acridin orange — se scoate un bloc de agar din zona în care se găsesc colonii caracteristice de aproximativ 1 cm^2 şi se aşază pe o lamă cu partea pe care se găsesc coloniile lipită de sticla lamei. Lama se introduce în poziţie înclinată 45°, într-un pahar cu apă la 80°C şi se ridică brusc temperatura pînă aproape de fierbere. După ce agarul se topeşte, lama se spală uşor cu

apă distilată. Coloniile astfel fixate, se colorează 5 minute într-o soluţie de 0,1% acridin orange. La examenul microscopic în lumină ultravioletă, coloniile prezintă o fluorescenţă roşie strălucitoare; 3. examinarea coloniilor prin imunofluorescenţă — în acest caz sînt necesare seruri fluorescente specifice.

Caractere biochimice: pentru că o cultură de micoplasmă izolată dintr-un material patologic poate conţine germeni aparţinînd mai multor specii din genul Mycoplasma, este necesar să se determine puritatea culturii. În acest scop se examinează diferite caractere biochimice:

— Activitatea enzimatică faţă de glucide şi polialcooli (proba are o valoare diagnostică limitată pentru diferenţierea speciilor, întrucît proprietăţile zaharolitice ale tulpinilor sînt inconstante).

— Proba hemolizei — unele tulpini cultivate pe geloză PPLO cu sînge 5% (stratul de mediu trebuie să fie subţire) la 37°C, produc în curs de 3 zile hemoliza de tip beta. Producţia de hemolizine este condiţionată de mediu şi de condiţiile de incubare.

— Reducerea albastrului metilen.

— Reducerea CTT (clorurii de trifenil tetrazolium). La 100 ml mediu (lichid sau solid) se adaugă 0,5% clorură de trifenil tetrazolium. Cultura se examinează zilnic timp de 6 zile. Unele dau reacţii pozitive (roşu), altele negative.

— Testul cu benzidină. Tulpinile se însămînţează pe geloză cu ser de cal la care se adaugă 4% globule roşii de oaie şi 0,01% soluţie apoasă sterilă de benzidină. În cazul reacţiei pozitive coloniile apar colorate brun roşcat.

— Testul peroxidazei.

— Testul pentru evidenţierea activităţii lipolitice.

În tabelul nr. 28 sînt prezentate o parte din proprietăţile biochimice diferenţiale între 6 din speciile mai importante ale genului Mycoplasma.

TABELUL 28

Proprietăţile biochimice la unele specii din genul Mycoplasma

Specia	Hemol.	Lichef. ser coag.	Indol	Fermentare +	Fermentare −	Nitraţi	Reducere albastru metilen	Catalază
M. mycoides	α	+	—	glucoză, zaharoză, maltoză manoză, glicogen, dextrină, amidon	lactoză, xiloză salicină, glicol manitol, dulcitol	—	+	+
M. bovigenitalium	α			—			+	+
M. agalactiae	α	—	—				+	
M. mycoides var. caprae	α	+	+	glucoză, zaharoză, maltoză manoză, dextrină, glicogen	lactoză, galactoză, salicină manitol, dulcitol		+	
M. hyorhinis		—		—				
M. gallisepticum			—	—				

Sensibilitatea faţă de factorii de mediu. Rezistenţa faţă de temperatură este diferită de la o specie la alta: de exemplu la 56°C unele specii rezistă 3 minute, altele 30 minute; razele ultraviolete omoară micoplasmele în 3 ore

la distanța de 30 cm de sursă, ultrasunetele le distrug în 30 minute aproximativ 99%.

Antisepticele sînt active în următoarele concentrații: formolul 1‰ și fenolul 3‰ omoară germenii în 24 ore, meritiolatul 1/100 000 are o acțiune bactericidă, iar 1/1 000 000 bacteriostatică față de micoplasme.

Sînt rezistente față de sulfamide, față de unele antibiotice (penicilină) și față de acetatul de thaliu, ceea ce a permis prepararea unor medii selective prin adăugarea substanțelor respective la mediu. Se folosesc curent medii cu penicilină 500—100 UI/ml (inhibă bacteriile Gram+ nesporulate) sau cu acetat de thaliu 1:4 000 (bacteriostatic față de bacterii sporulate aerobe și față de unele Gram negative).

Testarea sensibilității micoplasmelor față de antibiotice se poate face prin metoda diluțiilor, în bulion PPLO, încorporarea antibioticelor sub formă de microcomprimate în agar, sau prin protecția embrionilor infectați cu diferite tulpini.

Micoplasmele sînt sensibile la spiromicină, tetraciclină, oxitetraciclină, cloramfenicol, neomicină, kanamicină.

Patogenitate: în condiții experimentale sînt în general patogene pentru specia animală de la care au fost izolate. Cu unele specii se poate reproduce mai ușor infecția experimentală la șoareci și șobolani dacă se adaugă substanțe adjuvante ca talc, kiselgur, hidroxid de aluminiu sau adjuvant Freund.

Unele specii posedă un echipament toxic — corpii microbieni spălați, concentrați și inoculați intravenos sau intraperitoneal la șoareci acționează neurotoxic (Thomas, 1967, citat de Drăghici și Ungureanu, 1972).

Proprietăți antigenice: identificarea micoplasmelor nu este posibilă fără diagnosticul serologic. În acest scop se pot folosi următoarele reacții:

— seroaglutinarea pe lamă — cu un antigen preparat dintr-o suspensie de germeni colorați cu roșu bengal;

— aglutinarea pe lamă cu sînge integral;

— seroaglutinarea în tub — cu un antigen constituit dintr-o suspensie de germeni ajustată la turbiditatea tubului 2 din scara Mac Farland, menținută 2 ore în baie de apă și peste noapte la frigider;

— fixarea complementului;

— inhibarea hemaglutinării, după tehnica aplicată în virusologie;

— inhibarea hemadsorbției — globulele roșii de om și animale sînt adsorbite pe suprafața coloniilor de *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. bovigenitalium*, *M. agalactiae*. După un prealabil contact între coloniile de micoplasme și serul specific, hematiile nu mai sînt adsorbite. Reacția se execută în godeurile unei plăci de plastic de tip Takatsy. Pe fundul godeurilor se repartizează o cantitate de 0,1 ml geloză PPLO. Mediul se însămînțează astfel ca după incubare să rezulte 5—20 colonii. Peste colonii se pun 0,025 ml ser specific (diferite diluții). După 30 minute de contact la temperatura camerei se adaugă cîte 0,025 ml suspensie de globule roșii 0,5% și se incubează la 37°C timp de 30 minute. Apoi placa se spală într-o baie de apă fiziologică și se examinează microscopic suprafața mediului din punct de vedere al cantității hematiilor adsorbite. În cazul reacției pozitive de inhibare a hemadsorbției coloniile nu trebuie să fie acoperite de hematii;

— imunodifuzie în gel;

— inhibarea creșterii prin anticorpii specifici — pe suprafața agarului însămînțat se aplică rondele îmbibate cu seruri (Clyde 1964, citat de Drăghici și Ungureanu, 1972) sau acestea se introduc în godeuri. În cazul reacției pozitive dezvoltarea va fi inhibată pe o anumită zonă în jurul rondelelor sau godeurilor cu ser.

Dintre toate reacţiile serologice, inhibarea creşterii prin anticorpi specifici pare a fi cea mai sensibilă. Este larg folosită pentru identificarea speciilor şi în determinarea anticorpilor din serul animalelor din focarele de boală.

Confirmarea identificării tulpinilor izolate, ca fiind Mycoplasma: mycoplasmele se pot confunda cu formele L. ale bacteriilor, prin aspectul coloniilor cît şi prin faptul că se cultivă pe medii cu penicilină.

După Fallon (1969) confirmarea se bazează pe următoarele criterii:

— *Morfologia coloniilor* — se examinează microscopic direct sau în preparate efectuate după metodele amintite la caracterele culturale.

— *Imposibilitatea de a detaşa coloniile de pe suprafaţa mediului solid.* Dacă se încearcă raclarea unei colonii cu ansa, centrul coloniei rămîne inclus în mediu.

— *Transplantarea pe medii fără antibiotice.* Pe aceste medii, coloniile formelor L ale bacteriilor revin la forma normală.

— *Transplantări pe medii fără ser.* Mycoplasma se dezvoltă în general numai pe medii cu ser.

— *Inhibarea creşterii prin anticorpi specifici:* proba se execută după tehnica indicată mai sus, dar este necesar ca în prealabil să se obţină culturi pure. În acest scop se însămînţează plăci cu culturi diluate astfel ca să se dezvolte colonii izolate. Din acestea se transplantează cu pipeta cîteva colonii în cîte un mediu lichid (se aspiră colonia cu agarul respectiv). Din culturile obţinute se fac din nou împrăştieri pe medii solide în plăci. Se fac astfel 6—7 treceri. Este necesară această purificare în special pentru izolarea micoplasmelor, din căile respiratorii sau genito-urinare.

Pentru identificarea speciei pe lîngă proba inhibiţiei creşterii se fac şi celelalte examene ale caracterelor biochimice serologice.

ORDINUL RICKETTSIALES

Microorganismele din ordinul *Rickettsiales* au o serie de caractere comune cu bacteriile cum sînt: forma, structura (au perete celular şi corpi cromatici), conţin atît ADN cît şi ARN, multiplicarea prin diviziune directă, prezenţa unui echipament enzimatic propriu, sensibilitatea faţă de sulfamide şi antibiotice. Se deosebesc de bacterii prin imposibilitatea cultivării pe medii inerte. Rickettsiile sînt, ca şi virusurile, parazite intracelulare obligatorii şi se înmulţesc numai în celula vie. Datorită acestor proprietăţi poziţia lor taxonomică a fost multă vreme discutată, unii considerînd că fac parte din clasa Schizomycetes, alţii că sînt virusuri. În determinatorul Bergey 1957, rickettsiile sînt grupate într-o clasă aparte: clasa *Microtatobiotes* în care sînt situate împreună cu virusurile. Deşi în lucrarea de faţă ne-am ghidat aproape în exclusivitate după manualul lui Bergey 1957, separarea rickettsiilor de virusuri şi amplasarea lor în rîndul bacteriilor este astăzi unanim acceptată şi o adoptăm fără rezerve.

FAMILIA RICKETTSIACEAE

În această familie sînt incluse rickettsiile, care de regulă se transmit prin gazde intermediare.

Genul Coxiella

Specia Coxiella burneti (Rickettsia burneti)

Gazde receptive şi infecţii naturale: C. burneti este agentul etiologic al febrei Q (Query fever) întîlnite la om şi animale. La om se manifestă ca o infecţie febrilă, acută, denumită şi tifos pulmonar. La animale febra Q poate evolua ina-

parent sau cu manifestări clinice diferite: la ovine — avort, la bovine — avort sau mamite. Se întîlneşte mai rar la porcine, solipede şi carnasiere. Multe mamifere, păsări sălbatice, acarieni sînt purtători şi transmiţători. Infecţia se poate transmite prin numeroase specii de căpuşi, la care rickettsiile parazitează tubul digestiv şi se elimină prin fecale. La unele specii de căpuşi se transmite transovarian. În ţara noastră au fost semnalaţi ca vectori următoarele artropode: *Rhipicephalus sanguineus, Melophagus ovinus, Hypobosca equina* (Nestorescu, 1961). *Coxiella burneti* se poate transmite însă şi direct fără intermediul căpuşilor.

Surse de izolare: avortoni, secreţii vaginale, lapte 3—5 ml recoltat după spălarea ugerului cu apă şi alcool de 70°), placenta (recoltată la maximum 10 ore de la eliminare), artropode.

Examen microscopic direct: în frotiurile din materialul patologic, colorate cu metoda Giemsa, Castaneda, Machiavello, Stamp (vezi pag. 224) germenii se găsesc în număr mare intracitoplasmatic.

Condiţii de cultivare şi conduita de izolare: se multiplică numai în celula vie. Se cultivă curent pe ouă embrionate (embrionii de 7 zile inoculaţi intravitelin, mor în 4—5 zile). Cu rezultate bune se pot folosi şi culturile de celule (preparate din embrioni de găină de 4 zile).

În vederea izolării, materialul suspect poate fi inoculat în prealabil la cobai intraperitoneal dacă materialul nu conţine altă floră bacteriană şi subcutan sau intramuscular dacă este contaminat. În cazul placentei, se inoculează 0,5 g ţesut cotiledonar cu adaos de penicilină (1 000—5 000 UI); în cazul artropodelor se folosesc circa 50 exemplare, dezinfectate în baie de eter cu alcool, spălate în apă distilată sterilă şi după mojarare suspendate în 10—15 ml bulion sau soluţie fiziologică. Se inoculează 1—3 ml intraperitoneal după aseptizare cu penicilină. De

la cobaii în faza febrilă se recoltează sînge din cord, cu care se inoculează apoi embrionii. În cazul infecţiilor mortale, de la cadavrele proaspete de cobai, se recoltează în condiţii sterile organe (de preferinţă splina), care mojarate şi suspendate în ser fiziologic pot de asemenea servi trecerii pe embrioni.

Izolarea prin inocularea materialului patologic direct în sacul vitelin al embrionului de găină este posibilă numai în cazul materialelor necontaminate. Se inoculează la embrionii de 7 zile şi obişnuit se fac 1—3 treceri oarbe după care germenii devin evidenţiabili în frotiurile din sacul vitelin.

Identificare

Morfologie: formă cocoidă sau bacilară, de 0,25—1,5 microni, uneori filamentoasă, dispus izolat sau grupat perechi sau în lanţuri scurte.

Rezistenţa: în general germenul este rezistent. În stare uscată supravieţuieşte cîţiva ani la temperatura camerei. Se conservă bine la —30° —70°C. Rezistă pînă la 30 zile în carne; în lapte încălzit la 90°C rezistă pînă la o oră. Rezistă 15 minute în formol 1%, acid acetic 5% şi 5 minute în sodă caustică 5%. Este sensibil la antibiotice din seria tetraciclinelor.

Proprietăţi antigenice: în sîngele animalelor bolnave anticorpii apar după 4—20 zile de la infecţie şi se menţin timp îndelungat (peste un an). Diagnosticul serologic se face prin RFC cu antigen preparat din saci vitelini de embrioni.

Patogenitate: se datoreşte virulenţei. Experimental, infecţia poate fi reprodusă la cobai (intraperitoneal, intramuscular, subcutan), iepure (orice cale), şoarece (intranazal); animalul de elecţie a rămas însă cobaiul. Inocularea subcutană sau intradermică la această specie este

urmată de o reacţie inflamatorie locală, care se termină deseori cu moartea.

Genul Ehrlichia

Specii: E. canis, E. bovis, E. ovina

Gazde receptive şi infecţia naturală: sînt specii patogene pentru rumegătoare şi alte specii la care produc monocitoza rickettsiană întîlnită în regiunile tropicale. Germenii se localizează în citoplasma monocitelor. Boala se transmite prin căpuşile *Rhipicephalus sanguineus (E. canis), Hyalomma sp. (E. bovis) şi Rhipicephalus bursa (E. ovina).*

Condiţii de cultivare şi izolare: nu s-a reuşit izolarea şi cultivarea în afara organismului gazdelor natural receptive.

Identificare

Morfologie: sînt elemente elipsoidale, cu diametrul de 0,2—0,3 microni; se găsesc intracitoplasmatic grupate în colonii în interiorul monocitelor circulante. Se colorează bine prin metoda Giemsa.

Patogenitate: în condiţii experimentale, s-a putut reproduce infecţia la gazdele natural receptive cu sînge recoltat de la animalele bolnave.

Genul Cowdria

Specia C. ruminantium

Gazda receptivă şi infecţia naturală: este agentul etiologic al hidropericarditei (heartwatter) la caprine, ovine

și bovine, întîlnită în sudul Africii. Boala se transmite prin căpușile *Ixodidae*.

Condiții de cultivare și izolare: nu există date privind cultivarea.

Identificare

Morfologie: mai frecvente sînt formele sferice sau elipsoidale, mai rare cele bacilare. În celulele endoteliale ale animalelor bolnave formele cocoide au 0,2—0,5 microni diametru; la căpușe, predomină formele bacilare avînd 0,4—0,5 microni lungime și 0,2—0,3 microni grosime. Se colorează cu Giemsa. Este Gram negativ.

Patogenitate: în condiții experimentale, boala se poate reproduce la capre prin inocularea sîngelui virulent intravenos. Dintre animale mici este sensibil numai dihorul.

FAMILIA CHLAMYDIACEAE

Germenii din familia *Chlamydiaceae* se deosebesc de *Rickettsiaceae* printre alte caractere, prin absența vectorilor ca factori de transmitere a infecțiilor.

Toate microorganismele aparținînd acestei familii sînt încadrate într-un singur gen — Chlamydia. Ca denumire de uz curent se mai folosește pentru acești germeni și cea de „grupul psitacoză limfogranulomatoză-trahom".

Genul Chlamydia (Miyagawanella, Bedsonia, Pararickettsia)

Caracterele comune ale genului constau în cultivabilitatea pe embrion, o structură comună antigenică, prezența glicogenului în microcoloniile intracitoplasmatice și sensibi-

litatea la sulfadiazina de sodiu. Toate tulpinile, avînd chiar gazde diferite şi producînd boli diferite, sînt astăzi incluse în 2 specii: *Chlamydia trachomatis* şi *Chlamydia psittaci.* Prima specie cuprinde tulpinile care produc la om limfogranulomatoza malignă (veneriană) şi trahomul, iar cea de a 2-a tulpinile care produc îmbolnăviri la animale dintre care sînt bine definite ca entităţi morbide psittacoza sau ornitoza şi avortul enzootic al ovinelor.

Specia Chlamydia psittaci (ornithosis)

Gazdă receptivă şi infecţia naturală. Microorganismele din această specie se izolează de la numeroase specii animale, rolul lor de agenţi etiologici ai unor îmbolnăviri nefiind totdeauna bine definit. Infecţiile cele mai importante pentru patologia veterinară sînt ornitoza sau psittacoza, o zoonoză gravă întîlnită la diferite specii de păsări (mai frecvent porumbei, raţe, păsări de apartament etc.) şi transmisibile la om şi avortul enzootic sau pararickettsian al ovinelor.

Surse de izolare: în cazuri de ornitoză: lichid pericardic, saci aerieni, sînge, pulmoni cu leziuni, splină. În cazuri de avort enzootic la ovine: avortoni, învelitori fetale, secreţii vaginale.

Examen microscopic direct: în frotiurile din leziuni colorate prin metoda Stamp (vezi pag. 224) sînt prezenţi germeni grupaţi în colonii intracitoplasmatice.

Condiţii de cultivare şi conduita de izolare: germenii se cultivă în bune condiţii în ouă embrionate unde se dezvoltă în sacul vitelin. În vederea izolării, este recomandabilă instilarea intranazală la şoareci (mai ales în cazurile de avort enzootic la ovine). După moartea şoarecilor, se recoltează pulmonii care pot fi utilizaţi fie pentru noi treceri, fie pentru inoculări la embrioni.

Morfologie: elemente corpusculare, avînd formă în majoritatea cazurilor ovală și dimensiuni de 200—350 microni; sînt slab acido-rezistente. Sînt filtrabile.

Structura antigenică: tulpinile aviare și ovine sînt apropiate din punct de vedere antigenic. Reacția cea mai sensibilă pentru diagnosticul serologic al infecțiilor cu *Chlamydia psittaci* este RFC.

Patogenitate: animalul de elecție este șoarecele tînăr, care inoculat pe cale intranazală face o pneumonie caracteristică. În pulmonii șoarecilor morți se găsesc numeroși germeni.

PARTEA
II

METODE DE EXAMINARE ȘI IDENTIFICARE A BACTERIILOR

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

MĂSURI DE PROTECȚIA MUNCII ÎN LABORATORUL DE BACTERIOLOGIE

În laboratorul de bacteriologie se impune respectarea anumitor norme de protecția muncii, pentru a se evita în primul rînd, infecțiile accidentale de laborator, răspîndirea materialului infectat, după cum și accidente din cauza executării defectuoase a unor operații de pregătire și manipulare a materialelor (autoclavarea, prepararea unor soluții etc.). Pe baza normelor stabilite de ministerele de resort, fiecare instituție întocmește instrucțiuni locale detaliate care se prelucrează periodic și se afișează la locurile de muncă. În principiu, se au în vedere următoarele reguli:

— Lucrările de laborator se efectuează numai de personal special instruit, echipat cu îmbrăcăminte de protecție corespunzătoare, ce se poate spăla și dezinfecta (halat, șorț, bonetă și pentru anumite lucrări mască, ochelari, mănuși de cauciuc, cisme de cauciuc etc.).

Pentru autopsie se recomandă folosirea în exclusivitate a instrumentelor, iar operațiunile în care se impun manipulări directe cu mîna trebuie executate sub protecția unor mănuși de cauciuc. Imediat după folosire, instrumen-

tele (pense, foarfeci, bisturie etc.) se sterilizează prin fierbere sau autoclavare și apoi se curăță.

— După executarea însămînțărilor este obligatorie sterilizarea imediată a pipetelor Pasteur sau a anselor de însămînțare. Ansele se sterilizează prin încălzire la roșu în flacără și pipetele prin introducere în recipiente cu soluții dezinfectante (sublimat 1‰ sau amestec sulfo-cromic preparat din 100 g bicromat de potasiu și 2 000 ml apă, peste care se adaugă picătură cu picătură 200 ml acid sulfuric tehnic).

— Tuburile, cutiile Petri, plăcile etc. cu culturi microbiene neutilizabile, se adună în găleți sanitare cu capac, se sterilizează prin autoclavare și abia apoi se spală. Cadavrele sau alte materiale patologice se incinerează. Cînd nu există această posibilitate, ridicarea și trimiterea lor la ecarisaj trebuie făcută cu grija de a nu împrăștia materialul infecțios. Cadavrele animalelor mici de laborator pot fi în prealabil sterilizate prin autoclavare.

— Este interzis să se mănînce, să se fumeze, în încăperile unde se lucrează cu material infectat. Personalul trebuie să se spele pe mîini după executarea lucrărilor și apoi să se dezinfecteze cu alcool sau cînd se impune o dezinfecție mai severă, cu soluție de $HgCl_2$ 1‰. În timpul lucrului se evită atingerea cu mîna a feței, părului etc.

În cazul cînd se produc contaminări accidentale în laborator, se iau primele măsuri de ajutor și anume (după Linsert, 1970):

— Dacă materialul infectat ajunge în gură: nu se înghite, ci se elimină imediat, se clătește gura cu apă și apoi se face gargară cu permanganat de potasiu 0,1%, apă oxigenată 1% sau soluție de tinctură de iod (5 picături la un pahar apă). Apoi se clătește cu apă, repetîndu-se de mai multe ori timp de cîteva ore. Dacă, accidental, materialul a fost înghițit, se clătește bine gura cu apă, apoi cu soluție proaspătă de permanganat de potasiu

0,1% şi se iau produse care conţin acid clorhidric (de ex.: HCl N/10, pepsină).

— În cazul cînd materialul infectat ajunge în ochi, se evită frecarea, se spală sacul conjunctival abundent cu apă de mai multe ori, apoi se fac instilări cu colire antiseptice, de ex., penicilină 20 U.I./ sau unguente cu antibiotice — penicilină, tetraciclină (reverin), soluţie de azotat de argint 1‰.

— În cazul rănirilor produse de animalele de experienţă prin muşcătură sau zgîriere sau în urma manipulării neîndemînatice a unor instrumente, se lasă rana să sîngereze bine, se badijonează cu tinctură de iod sau se aplică pulberi, unguente, soluţii cu sulfamide sau antibiotice.

— În infecţii accidentale mai periculoase cu material ce conţine agenţii etiologici ai antraxului, turbării, tetanosului, rănile se cauterizează cu precauţie, cu acid azotic fumans şi se apelează imediat la medic.

În afara pericolului infectării, personalul din laborator trebuie bine instruit în privinţa manipulării aparaturii, cît şi a unor chimicale (de ex.: sticlele cu eter se vor ţine bine închise şi departe de flacără, sau pentru diluarea acidului sulfuric se toarnă acidul încet în apă şi nu invers). Pentru a evita accidentele în timpul manipulării unor aparate (autoclavul, centrifuga etc.) pe lîngă faptul că acestea se vor încredinţa unui personal bine instruit, este necesar să se afişeze în dreptul aparatelor respective şi modul de funcţionare.

METODE DE STERILIZARE

În majoritatea cazurilor, o primă condiţie pe care trebuie s-o îndeplinească materialele folosite pentru examinarea, cultivarea, manipularea şi păstrarea în laborator a diferitelor microorganisme este sterilitatea. Operaţiunea

prin care este asigurată această condiţie se numeşte sterilizare. Ea constă în distrugerea sau îndepărtarea microorganismelor dintr-un spaţiu sau de pe o suprafaţă dată.

Sterilizarea se face cu ajutorul agenţilor fizici sau chimici.

STERILIZAREA PRIN AGENŢI FIZICI

Căldura uscată sau umedă este unul din cei mai importanţi factori sterilizanţi.

STERILIZAREA PRIN CĂLDURĂ USCATĂ

Sterilizarea prin flambare. Este cea mai simplă metodă de sterilizare, care constă în trecerea obiectului respectiv prin flacără timp de cîteva secunde, o dată sau de mai multe ori, la intervale scurte (3—4 secunde).

Flambarea se foloseşte pentru sterilizarea pipetelor Pasteur (suprafaţa exterioară), a gurii tuburilor şi diferitelor flacoane şi sticle în care urmează să se însămînţeze sau din care să se recolteze material microbian.

Sterilizarea prin încălzire la roşu. Această metodă constă în ţinerea unui obiect metalic mai mult timp la flacără, pînă la înroşirea acestuia. Această metodă este folosită pentru sterilizarea firului metalic al ansei de însămînţare, precum şi a spatulelor.

Sterilizarea cu aer cald. În acest scop, se folosesc cuptoare metalice cu aer cald, variate ca modele de construcţie şi denumiri (cuptor Pasteur, etuvă, sterilizator Poupinel, cuptor Arnold), încălzite electric, care principial nu diferă de un cuptor obişnuit.

Prin aer încălzit se sterilizează sticlăria de laborator (eprubete, fiole, cutii Petri, pipete, mojare etc.).

Obiectele destinate sterilizării trebuie să fie spălate şi uscate. Apoi, sînt pregătite pentru sterilizare astfel: plăcile Petri, mojarele cu pistil se înfăşoară în hîrtie; eprubetele, fiolele, ţeava pentru pipete Pasteur se astupă cu dopuri de vată; pipetele gradate se astupă, la extremitatea prin care se aspiră, cu vată şi se învelesc în hîrtie. Materialele sînt ţinute la sterilizat pînă ce hîrtia albă în care sînt împachetate capătă, sub acţiunea căldurii, o culoare brună. Colorarea hîrtiei constituie o indicaţie sigură că sterilizarea a fost bine făcută; de aceea nu este nevoie de alţi indicatori de temperatură. Temperatura sterilizantă este de 180°C.

STERILIZAREA PRIN CĂLDURĂ UMEDĂ

Sterilizarea prin fierbere. În acest scop, se folosesc sterilizatoare electrice sau încălzite cu bec de gaz ori cu lampă de spirt. Prin fierbere se sterilizează de regulă instrumentele metalice (pense, foarfece, bisturie), precum şi seringile. Pentru protejarea instrumentelor metalice de acţiunea nocivă a unor săruri din apa de robinet se recomandă fierberea în apă distilată, la care se poate adăuga borax, care împiedică ruginirea. Adăugarea boraxului sau a carbonatului de sodiu ridică totodată punctul de fierbere al apei. Durata fierberii trebuie să fie de 30 minute. Fierberea nu este o metodă de sterilizare completă, deoarece temperatura de 100°C, sub formă de căldură umedă, nu distruge totdeauna toţi sporii bacterieni. De aceea nu se foloseşte decît atunci cînd nu se cer condiţii riguroase de sterilitate, iar obiectele sterilizate prin fierbere nu pot fi întrebuinţate decît imediat după sterilizare.

Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclavarea). Autoclavarea este o metodă de sterilizare cu vapori de apă sub presiune. Aparatul necesar pentru această me-

todă este autoclavul Chamberland care poate fi construit după diferite modele și dimensiuni. În principiu, este un cazan cu pereții groși care se poate închide ermetic cu un capac care se fixează în buloane. Cazanul este prevăzut cu un orificiu sau două prin care comunică cu un robinet, un manometru și o supapă de siguranță. În interior, se introduce apă pînă la un anumit nivel. Încălzirea se poate face electric sau cu bec de gaz.

Modul de funcționare: după introducerea materialului de sterilizat, se fixează capacul cu buloane, se încălzește lăsînd robinetul deschis pînă cînd jetul de vapori devine continuu. În acest moment, se închide robinetul și se continuă încălzirea pînă cînd manometrul indică presiunea necesară, apoi se micșorează flacăra, pentru a se menține presiunea constantă timpul necesar. O sterilizare eficientă, care asigură distrugerea celulelor vegetative și a sporilor, se realizează în intervale care sînt în funcție de următoarele presiuni și temperaturi:

— la 0,5 atmosfere (112°C) — 90 minute;
— la 1,0 atmosfere (120°C) — 30 minute;
— la 2,0 atmosfere (134°C) — 10 minute.

Obișnuit se practică sterilizarea prin autoclavare la o atmosferă (120°C) timp de 30 minute.

După terminarea sterilizării se închide flacăra, se lasă să scadă presiunea și apoi se deschide aparatul. Nu trebuie neglijat acest amănunt pentru că în caz contrar se pot produce accidente datorită diferenței bruște de presiune.

Autoclavarea se indică pentru sterilizarea mediilor de cultură, a obiectelor sau aparatelor prevăzute cu garnituri de cauciuc (de ex.: baloane pentru recoltat sînge, filtre bacteriologice), a culturilor vechi care nu mai sînt necesare.

Sterilizarea prin încălzire fracționată sau tindalizare. Această metodă, preconizată de Tyndall în 1877, se utilizează în cazul cînd substanțele de sterilizat au un grad de termolabilitate, denaturîndu-se printr-o încălzire

la 120°C. Asemenea materiale sînt diferite medii de cultură cu substanţe hidrocarbonate sau cu substanţe proteice macromoleculare (mediile cu ou, serul coagulat). Sterilizarea fracţionată se face la temperatura care este suportată de materialele respective. Astfel, mediile cu zaharuri se tindalizează la 100°C, serul coagulat sau mediile cu ou se tindalizează la 70—80°C. Cînd materialele suportă temperatura de 100°C, tindalizarea se execută de regulă în autoclav. În acest caz, capacul nu se strînge cu buloane, iar robinetul rămîne tot timpul deschis. Materialele se sterilizează în vapori de apă la presiune normală. În cazurile cînd temperatura de 100°C nu este suportată de materialele de sterilizat, tindalizarea va fi făcută la temperatura suportată în băi de apă, sau în cazul mediilor de cultură, care necesită şi un proces de coagulare, în aparate speciale — coagulatoare.

Sterilizarea fracţionată constă în încălzirea la temperatura respectivă a materialelor de sterilizat timp de 30—60 minute, la interval de 24 ore, de trei ori consecutiv. În prima zi de încălzire, se distrug formele vegetative ale bacteriilor, iar sporii rezistă. Aceştia se transformă după 24 ore de incubaţie la 37°C în forme vegetative, care vor fi distruse prin încălzire a doua zi. Încălzirea de a treia zi se face pentru a asigùra sterilizarea, distrugînd ultimele forme vegetative rezultate din germinarea sporilor care au mai rămas şi după a doua încălzire. În intervalele dintre încălziri, mediile se ţin la termostat (37°C) sau la temperatura camerei (18—25°C).

STERILIZAREA PRIN RAZE ULTRAVIOLETE

Radiaţiile cu lungimi de undă între 2540—2800 au efectul germicid cel mai puternic. Razele ultraviolete sînt nocive pentru formele vegetative ale bacteriilor distrugîn-

du-le, au însă o acţiune mai redusă asupra sporilor. În mod curent, în laboratoarele de bacteriologie, lămpile cu raze ultraviolete se folosesc pentru iradierea boxelor sterile.

FILTRAREA

Pentru sterilizarea substanţelor ce se modifică sub acţiunea căldurii, se foloseşte filtrarea (o metodă mecanică de sterilizare), care constă în trecerea unui lichid prin pereţii poroşi ai unui filtru. Filtrarea nu este o metodă perfectă de sterilizare deoarece microbii cu dimensiuni foarte mici cum sînt virusurile şi chiar unele bacterii (micoplasme, rickettsii) pot traversa pereţii filtrelor.

În lucrările de bacteriologie se folosesc diferite tipuri de filtre deosebite prin materialul din care sînt confecţionate. În cadrul fiecărui tip se folosesc diferite notări, în funcţie de dimensiunile porilor:

1. Filtrele Chamberland, din porţelan poros, se notează cu litera L urmată de o cifră L_1, L_2 etc., dimensiunea porilor fiind invers proporţională cu numărul.

2. Filtrele Berkefeld, din pămînt de infuzorii, se notează cu literele W (Wenig), V (Viel), N (normal), cele notate cu W au porii cei mai mici, iar cele cu V porii cei mai mari.

3. Plăcile filtrante de asbest pentru filtrele Seitz se notează cu EK, EK_1 şi EK_2. Filtrele EK_1 reţin bacteriile, EK_2 reţin şi virusurile mai mari.

4. Filtrele de sticlă se notează cu litera G urmată de o cifră, cele notate cu G_5 reţin bacteriile.

5. Membranele filtrante. Se pot confecţiona din diverse materiale cum sînt colodiul, celuloza, gelatina, iar în ultimul timp diferite mase plastice. Membranele filtrante au utilizări, în special, în virusologie şi în toate împre-

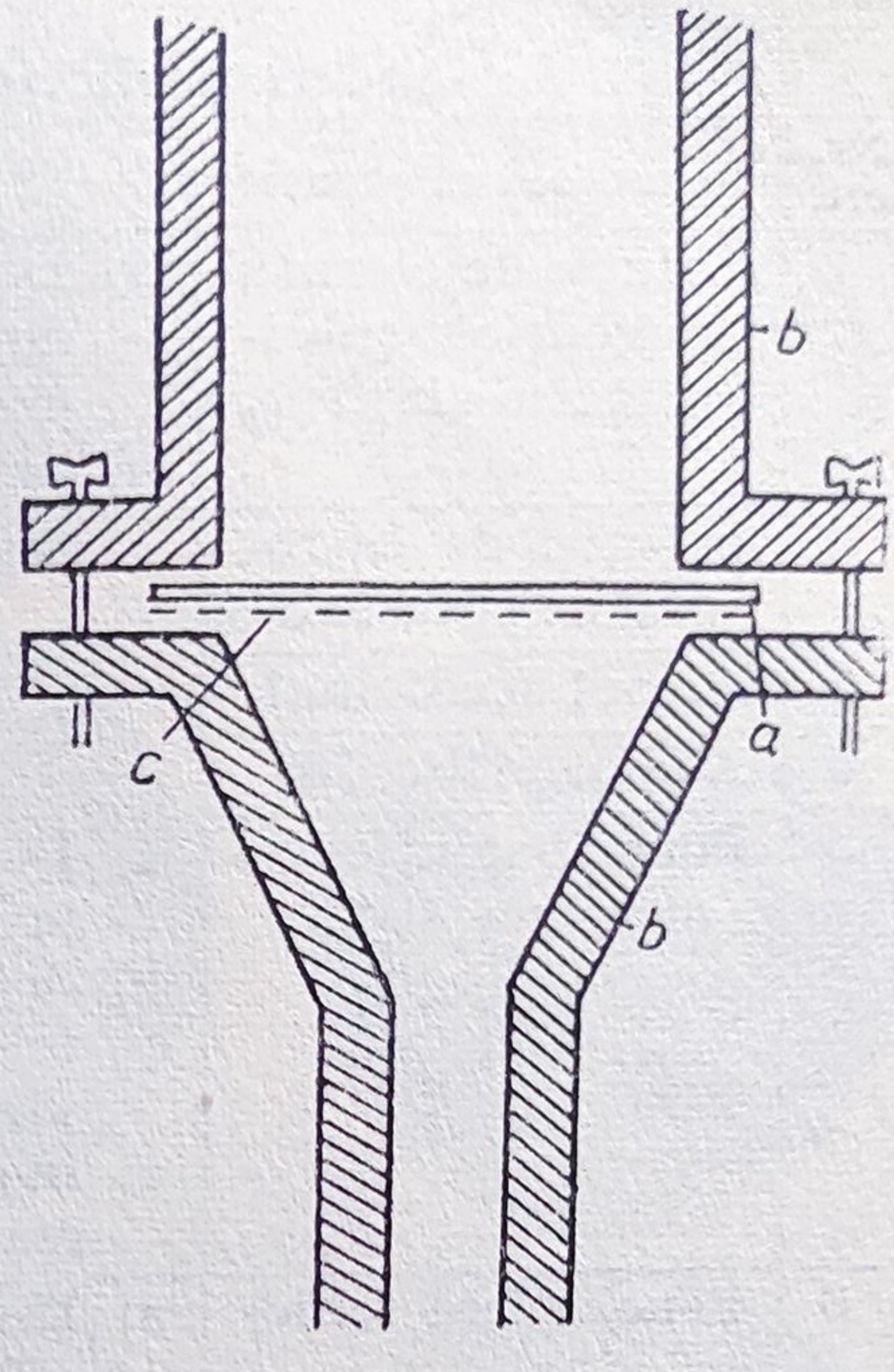


Fig. 7 — Filtru Seitz:
a — placa filtrantă; *b* — armătura metalică constituită dintr-o piesă superioară şi una inferioară; *c* — sită metalică

jurările în care sînt necesari pori foarte mici (5—3 000 milimicroni).

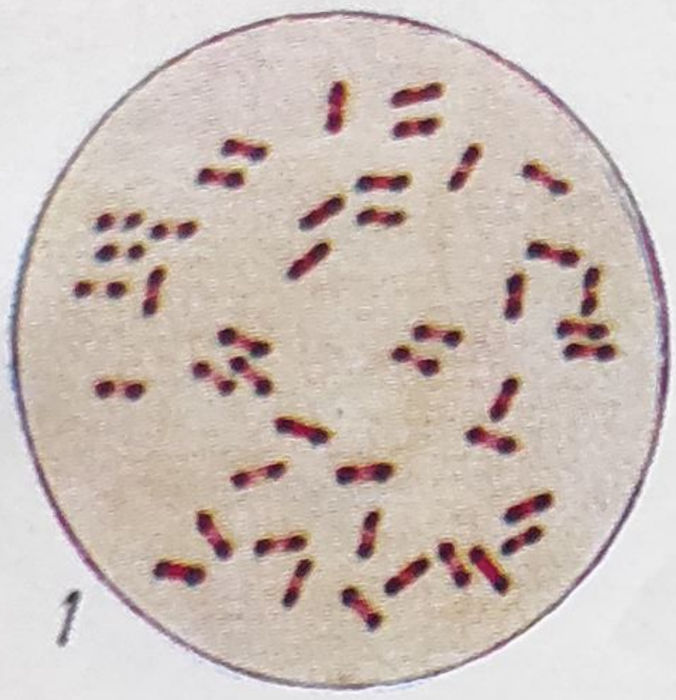
Trecerea lichidelor de sterilizat prin porii filtrului se face prin aspiraţie cu o pompă de vid. În acest scop, filtrele se adaptează la un balon Kitasato, care se pune în legătură cu o pompă de vid prin intermediul unui tub de cauciuc. Aparatul de filtrare constituit din balon plus filtru se sterilizează în prealabil prin autoclavare, după ce tubul lateral al balonului s-a astupat cu vată, s-a împachetat în hîrtie, iar filtrul s-a învelit de asemenea cu hîrtie. În momentul întrebuinţării, aparatul se adaptează la pompa de vid, filtrul se umectează cu apă distilată sau ser fiziologic, se toarnă materialul de filtrat în pîlnie şi se realizează vidul necesar (25—30 mm mercur).

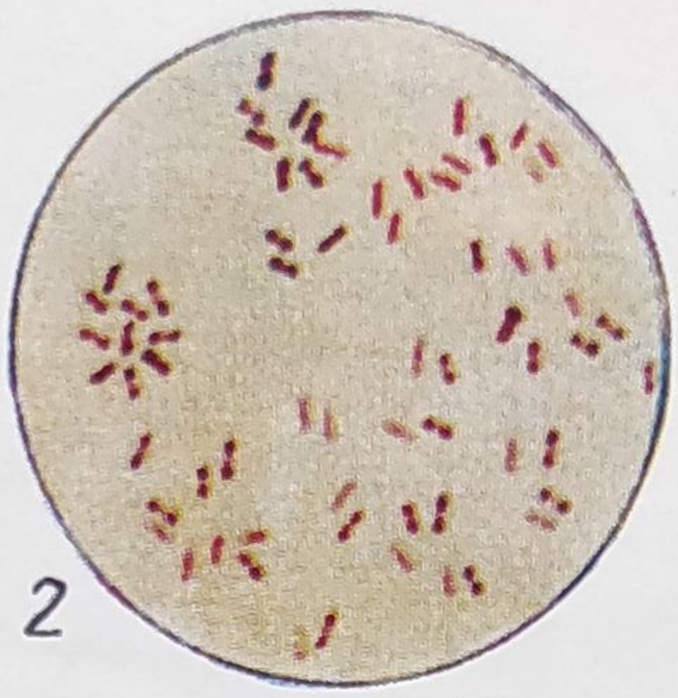
După folosire, aparatul de filtrare se sterilizează prin autoclavare. În cazul filtrelor Seitz sau al membranelor filtrante, după sterilizare, pîlnia în care sînt fixate se

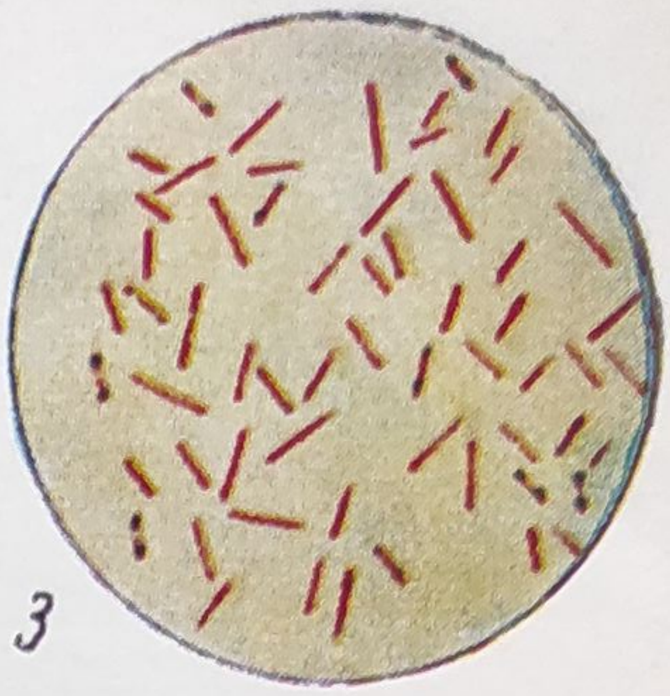
TABELUL 29

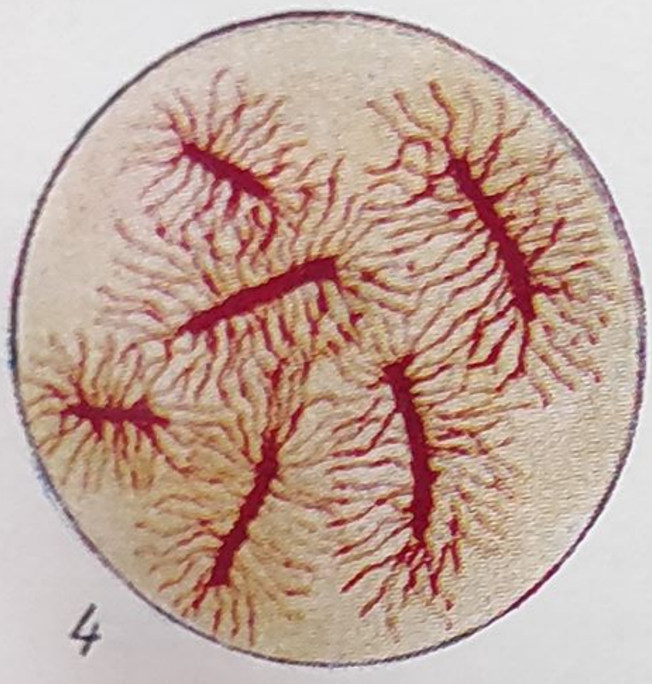
Agenţi sterilizanţi chimici de uz curent

Nr. crt.	Denumirea substanţei	Scopul în care este folosită
1	Soluţie de clorură mercurică (sublimat corosiv) $1^0/_{00}$	a) Dezinfecţia meselor şi altor categorii de mobilier, de sticlă, faianţă, lavă, material plastic etc. b) dezinfecţii mai riguroase ale mîinilor
2	Soluţie de bicromat de potasiu 5 %	Dezinfecţia pipetelor întrebiunţate
3	Alcool medicinal	Dezinfecţia curentă a mîinilor
4	Alcool etilic 70°	
5	Formol-soluţie comercială 40 %	a) Dezinfecţia obiectelor din sticlă, faianţă, lavă, metal, de laborator (în conc. de 5 %) b) dezinfecţia grajdurilor, curţilor, obiectelor în diferite infecţii bacteriene şi virotice, sol. 5 % c) inactivitatea culturilor microbiene în vederea preparării unor vaccinuri (conc. 0,1–2 %)
6	Fenol (acid fenic)	a) Dezinfecţia diferitelor obiecte din sticlă, porţelan, metal etc. (sol. 5 %) b) conservarea serurilor imune (conc. 0,5%)
7	Tinctura de iod	Dezinfecţia locurilor de puncţie
8	Apa oxigenată	Dezinfecţia mucoaselor
9	Soluţie de permanganat de potasiu 0,1 %	Dezinfectarea mucoaselor
10	Acid acetic 1 %	Dezinfectarea pipetelor şi lamelor în laboratoarele care se ocupă cu studiul germenilor din genul *Leptospira*
11	Hidroxid de sodiu (soda caustică)	a) Dezinfecţia mobilierului, duşumelelor, cuştilor de animale (conc. 3 %) b) Dezinfecţia adăposturilor de animale şi a curţilor în caz de epizootii (conc. 3 %)
12	Cloramina	a) Dezinfecţia mîinilor (sol. 1 %) b) Dezinfecţia meselor de laborator, cuştilor de animale (conc. 5 %)
13	Clorura de var	Dezinfecţia curentă a grajdurilor
14	Diferiţi detergenţi	a) Dezinfecţia mîinilor (sol. 0,1 %) b) Spălarea sticlăriei

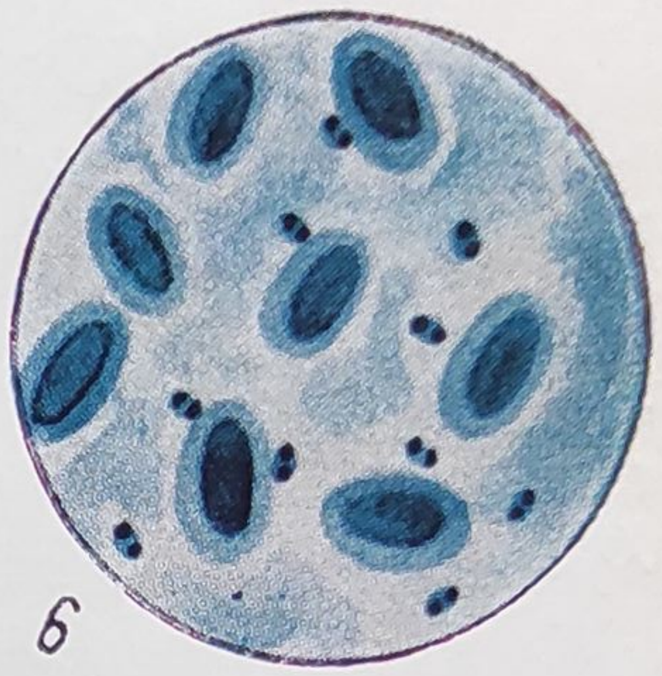

1

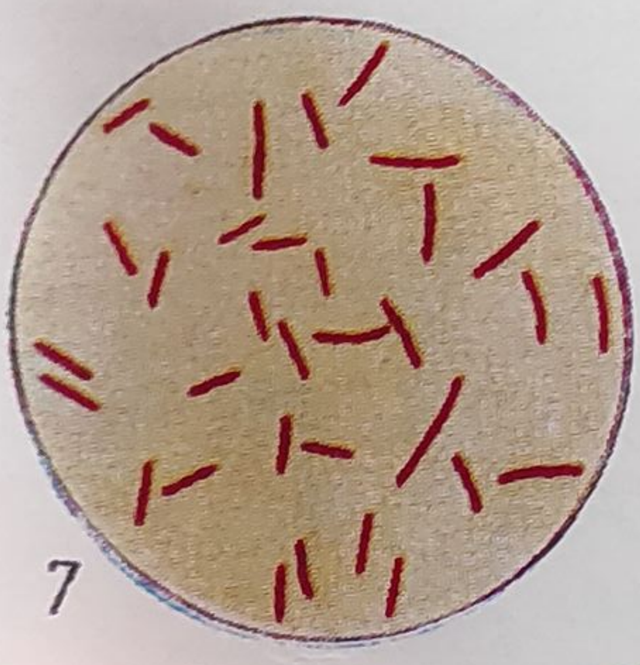

2


3


4

5

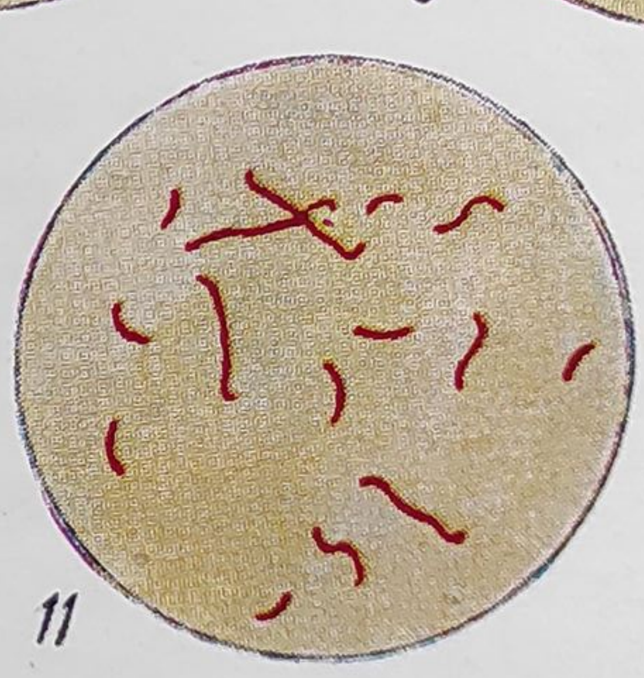

6


7

8

9

10


11

PLANȘA I — Bacterii Gram negative:

1 — Escherichia coli, coloraţie Gram, frotiu din cultură; *2 — Salmonella choleraesuis*, coloraţie Gram, frotiu din cultură; *3—4 — Proteus vulgaris*, frotiuri din cultură; *3* — coloraţie Gram; *4* — coloraţie Casares Gil; *5—6 — Pasteurella animalium*; *5* — frotiu din cultură, coloraţie Gram; *6* — frotiu din organ de pasăre, coloraţie cu albastru de metilen; *7 — Actinobacillus mallei*, coloraţie Gram, frotiu din cultură; *8 — Actinobacillus lignieresi*, coloraţie Gram, frotiu din cultură; *9 — Brucella abortus*, coloraţie Gram, frotiu din cultură; *10 — Sphaerophorus necrophorus*, coloraţie Gram, frotiu din cultură; *11 — Vibrio fetus*, coloraţie Gram, frotiu din cultură

demontează, se îndepărtează plăcile sau membranele filtrante, iar piesele se spală cu apă caldă și săpun. După uscare, se montează o placă sau o membrană nouă filtrantă. Filtrele de sticlă recuperează prin spălare într-un amestec de soluții concentrate de acid sulfuric și acid azotic, urmată de spălare cu apă distilată. Filtrele de sticlă se pot steriliza prin autoclavare sau în aer cald.

STERILIZAREA PRIN AGENȚI CHIMICI

Pentru sterilizarea prin agenți chimici se folosește curent termenul de dezinfecție. Această metodă se practică în laboratoarele de microbiologie pentru sterilizarea materialelor și obiectelor întrebuințate sau infectate accidental (tabelul 29). Niciodată nu se va utiliza pentru sterilizarea materialelor (instrumente, medii) destinate cultivării sau manipulării microbilor.

NORME GENERALE PRIVIND RECOLTAREA, PĂSTRAREA ȘI TRANSPORTUL DIFERITELOR MATERIALE PATOLOGICE ÎN VEDEREA EXAMENULUI MICROBIOLOGIC

Materialele și produsele care se expediază la laborator pentru diferite examene microbiologice sînt:

— animale în viață (mai ales cînd este vorba de specii mici), care prezintă simptomele unei boli microbiene;

— cadavre de animale (tot în cazul speciilor mici);

— diferite produse patologice recoltate de la animale în timpul vieții (secreții, excreții);

— produse patologice, după cum și organe recoltate de la cadavre;

— frotiuri;

— probe de sînge pentru reacții serologice.

Indiferent de natura materialului şi de scopul examenului, pentru recoltare, ambalare, expediere, păstrare (dacă este cazul), respectarea următoarelor norme de lucru este obligatorie:

— Cadavrele, produsele patologice sau organele recoltate de la cadavre trebuie să fie expediate la laborator în cel mai scurt timp după moarte, întrucît începerea proceselor de putrefacţie creează întotdeauna dificultăţi în diagnosticul bacteriologic şi uneori îl fac chiar imposibil, datorită prezenţei florei bacteriene de putrefacţie.

— Recoltarea trebuie să fie executată în aşa fel încît materialul să fie cît mai puţin expus infectării cu germeni din mediul ambiant.

— În cazul cînd prelucrarea nu se poate face din cadavre sau organe proaspete, sau cînd transportul durează un timp mai îndelungat, este obligatorie asigurarea unei temperaturi scăzute (în jur de 0°C) pentru materialele respective, ceea ce se realizează prin frigidere, lăzi izoterme, termose etc., în care materialele se păstrează sau se transportă la gheaţă. În cazul materialelor patologice provenind din infecţii virotice, în afara temperaturii scăzute este necesară şi folosirea a diferite lichide conservante; se recomandă îndeosebi o soluţie de 5% de glicerină în ser fiziologic.

— Ambalarea materialelor patologice în vederea transportului la laborator trebuie astfel făcută încît să asigure o cît mai strictă etanşeitate, pentru a se evita împrăştierea germenilor. În acest scop, cadavrele sau organele, după ce în prealabil se învelesc în pînză îmbibată cu o soluţie dezinfectantă (sublimat 0,1% sau acid fenic 3%), se ambalează în lăcliţe, care se închid ermetic.

— Probele pentru examenul bacteorologic, indiferent de natura materialului, trebuie să fie însoţite de note anamnetice cît mai explicite şi mai detaliate din partea medicului, privind evoluţia bolii, situaţia epizootologică, des-

crierea leziunilor etc. sau, mai bine-zis, toate datele care pot ajuta la stabilirea unui diagnostic bacteriologic.

6 — Probele de sînge pentru serodiagnostic trebuie să fie recoltate în condiţii cît mai sterile şi să aibă serul bine exprimat. În acest scop se recomandă ca probele recoltate să se ţină mai întîi la căldură (20—37°C) timp de 1—2 ore, după care se introduc la frigider sau în lăzi izoterme. Probele la care nu s-au produs retractarea cheagului şi exprimarea serului sînt improprii pentru executarea reacţiilor serologice.

Materialul care trebuie trimis pentru examen bacteriologic depinde de specia microbiană a cărei prezenţă este bănuită sau pentru care este necesar să se obţină un rezultat din partea laboratorului.

Detaliile privind recoltarea, ambalarea şi expedierea organelor şi produselor patologice în vederea examenului de laborator formează obiectul anexei 1 la instrucţiunile de aplicare a decretului nr.167/1955 privind organizarea apărării sănătăţii animalelor. Obligativitatea respectării prevederilor acestor instrucţiuni are, prin urmare, caracter de lege.

TEHNICA EXAMINĂRII CARACTERELOR MORFOLOGICE ŞI TINCTORIALE ALE BACTERIILOR

EXAMENUL MICROSCOPIC

Celula bacteriană, date fiind dimensiunile ei, nu poate fi văzută cu ochii liberi, ci numai cu ajutorul aparatelor optice amplificatoare. În vederea examenului microscopic, bacteriile pot fi examinate în stare vie, într-o suspensie în ser fiziologic, practică mai rar folosită şi numai în

împrejurări speciale, sau pe frotiuri fixate şi colorate după diferite tehnici, practică folosită în mod curent.

Pentru examenul microscopic curent al bacteriilor în frotiuri, secţiuni, ca şi în stare vie între lamă şi lamelă se foloseşte microscopul fotonic. Examinarea se face numai cu obiectivul de imersie. Datorită dimensiunilor lor, bacteriile nu pot fi vizionate în condiţii satisfăcătoare cu obiectivele uscate. Pentru examinarea unui frotiu cu obiectivul de imersie se procedează astfel:

— Se aşază lama pe platina microscopului şi se fixează cu cavalerul în aşa fel încît locul unde a fost etalat materialul microbian să fie situat în dreptul lentilei frontale a obiectivului.

— Se ridică condensatorul la maxim.

— Se stabileşte luminozitatea maximă a cîmpului cu ajutorul unuia din obiectivele uscate.

— Se depune o picătură de oleu de cedru pe frotiu.

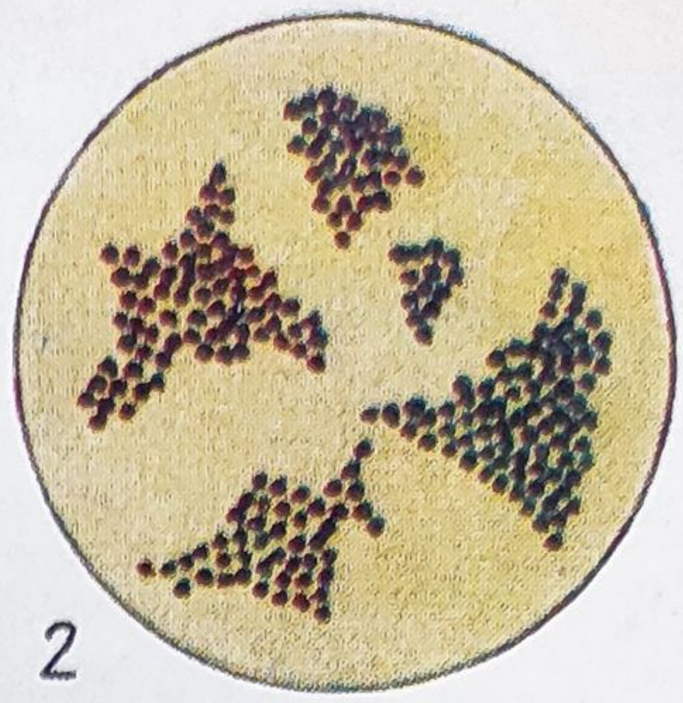
— Se coboară încet tubul microscopului, folosind viza macrometrică pînă cînd obiectivul de imersie se cufundă în oleu şi atinge suprafaţa lamei. Coborîrea tubului se face privind lateral, cu multă grijă, ferindu-se de o izbire brutală a lentilei de suprafaţa lamei, întrucît lentila frontală a obiectivului de imersie se dezancorează foarte uşor.

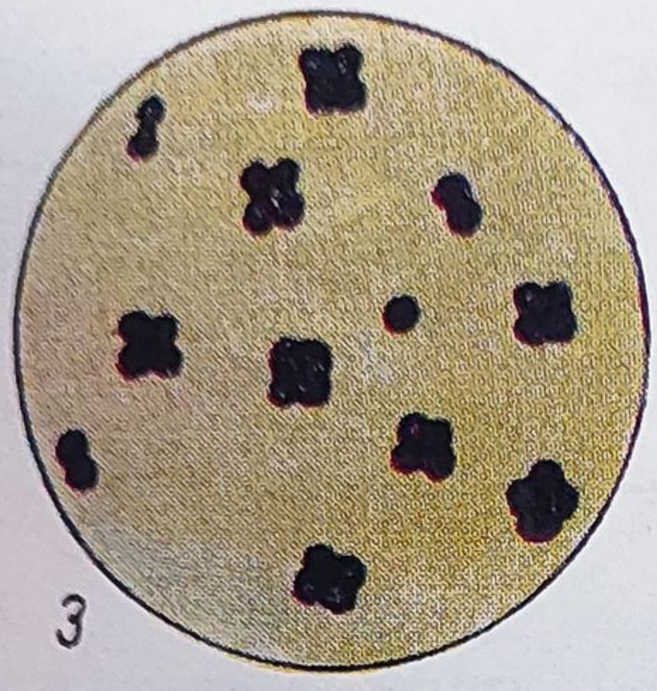
— Privind prin lentila ocular, se ridică tubul microscopului cu ajutorul vizei macrometrice, foarte încet pînă la apariţia imaginii, care se pune apoi la punct cu viza micrometrică.

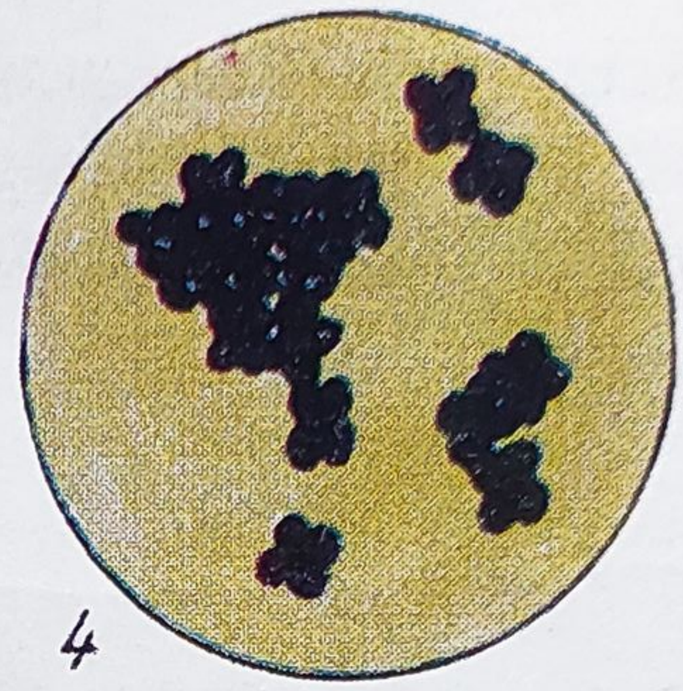
— În tot timpul observaţiei microscopice, se reglează claritatea imaginii cu viza micrometrică.

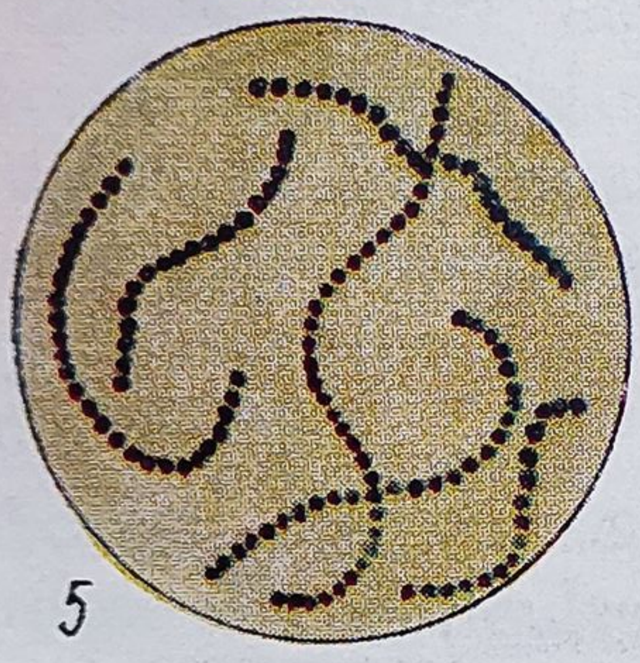
După terminarea observaţiei, se ridică întîi tubul microscopului cu viza macrometrică la o distanţă de 2—3 cm de lamă, se scoate lama de pe platină şi se şterge obiectivul de imersie cu pulpa degetului sau cu o cîrpă moale, uşor umectată cu xilol sau cloroform. La ştergerea lentilelor, trebuie să se aibă în vedere că excesul de xilol ar

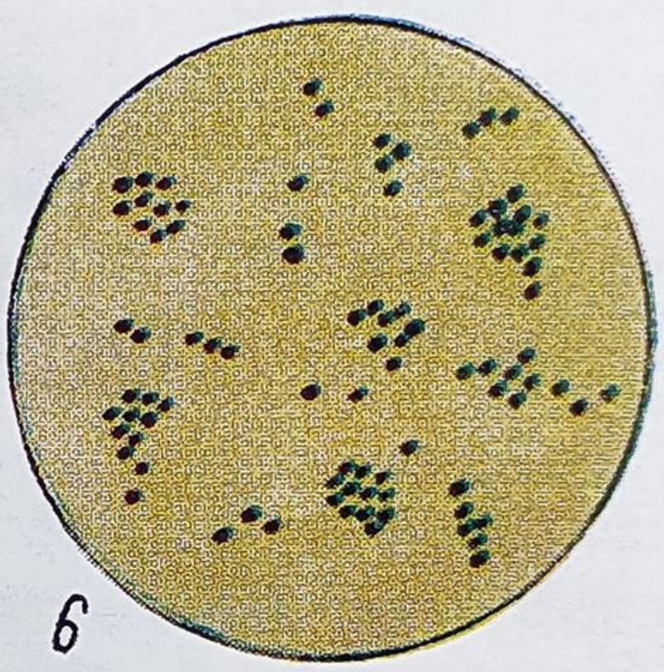
1

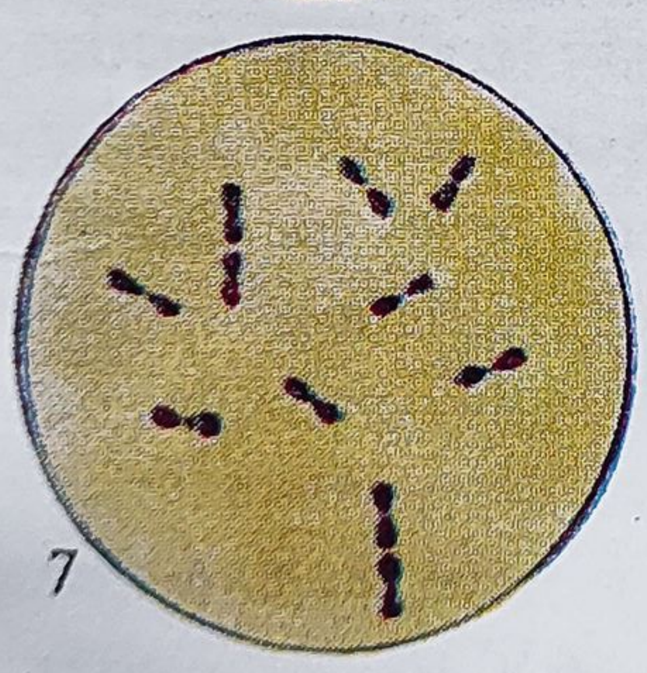

2


3


4


5


6


7

8

PLANȘA II — Coci :

1 — 2 — *Staphylococcus pyogenes*, colorație Gram; *1* — frotiu din cultură în bulion; *2* — frotiu din cultură pe agar; 3—4 — *Sarcina lutea*, colorație Gram; *3* — frotiu din cultură în bulion; *4* — frotiu din cultură pe agar; 5—6 — *Streptococcus equi*, colorație Gram; *5* — frotiu din cultură în bulion cu ser; *6* — frotiu din cultură pe agar cu ser; 7—8 — *Diplococcus pneumoniae*; *7* — frotiu din cultură în bulion cu ser, colorație Gram; *8* — frotiu din organ, colorație Giemsa

putea dizolva balsamul de Canada cu care este fixată lentila frontală a obiectivului.

Ca medii de imersie pot fi folosite diverse lichide al căror indice de refracţie este cît mai apropiat de cel al sticlei (n—1,5). Cel mai des se utilizează oleul de cedru (n—1,515), apoi benzoatul de metil (n—1,517), parafina lichidă (n—1,47), oleul de ricin, glicerina etc.

Pentru oleul de imersie se folosesc sticluţe speciale, formate din două recipiente: unul mai mic în care se pune oleul, altul mai mare în care se introduce xilol sau toluol.

EXAMENUL BACTERIILOR ÎN STARE VIE

Examenul între lamă şi lamelă: pe o lamă se pune o picătură dintr-o cultură bacteriană lichidă sau se execută o suspensie slab opalescentă în apă fiziologică din germeni raclaţi cu ansa dintr-o cultură pe mediu solid, se acoperă suspensia cu o lamelă şi se examinează imediat la microscop.

Această metodă se foloseşte în special pentru examenul leptospirelor din culturi. Întrucît aceste bacterii sînt extrem de subţiri, pentru vizionarea lor trebuie folosit un microscop la care se adaptează un condensator cardioid, iar examenul se face în cîmp întunecat. Mediul de imersie este glicerina, care trebuie să fie depusă atît între lamă şi condensator, cît şi între lamelă şi lentila obiectivului de imersie. În mod curent, examenul leptospirelor în cîmp întunecat este posibil şi cu obiective mai mici, în care caz nu este necesară depunerea lichidului de imersie pe lamelă.

Pentru examenul altor bacterii nu este necesar condensatorul cardioid, nici cîmp întunecat, dar se recomandă reglarea unei luminozităţi discrete a cîmpului microscopic.

Examenul în picătură suspendată: pe o lamelă, se depune o picătură de ser fiziologic în care se suspendă germenii de examinat.

Lamela se răstoarnă printr-o mișcare rapidă, în așa fel ca picătura de suspensie să nu se prelingă și se depune pe o lamă excavată; picătura suspendată trebuie să fie deasupra godeului, iar manipularea preparatului trebuie făcută în așa fel ca picătura să nu se prelingă și să nu ajungă în contact cu pereții godeului. Se examinează imediat la microscop.

Atît examenul între lamă și lamelă, cît și cel în picătură suspendată, se folosesc pentru punerea în evidență a mobilității bacteriilor ciliate.

În executarea examenului bacteriilor în stare vie trebuie respectate următoarele reguli:

— Cînd se execută suspensia trebuie avut grijă ca lama și pipeta sau firul metalic al acului de însămînțare să fie bine răcite, pentru a nu omorî germenii prin căldură.

— Examenul microscopic trebuie făcut cît mai rapid după depunerea culturii pe lamă sau executarea suspensiei pentru a nu se usca.

EXAMENUL BACTERIILOR ÎN FROTIURI COLORATE

TEHNICA EXECUTĂRII FROTIULUI

În vederea examinării, bacteriile sînt depuse pe o lamă. Operațiunea de întindere a materialului bacterian pe lamă este denumită în mod curent „executarea unui frotiu", termenul de frotiu fiind utilizat pentru desemnarea lamei cu material microbian etalat pe suprafața ei.

Materialele din care se execută frotiul sînt, de regulă, diferite organe sau lichide patologice, recoltate de la ani-

male în viaţă sau de la cadavre, precum şi culturi bacteriene.

Pregătirea lamei se face controlînd ca lama să fie perfect curată, apoi se face degresarea acesteia prin păstrare în alcool sau treceri consecutive prin flacăra becului de gaz de aproximativ 60 de ori, în aşa fel încît ambele feţe să fie flambate la fiecare trecere pe toată suprafaţa lor.

Executarea frotiului din organe şi materiale patologice lichide. Se pot folosi mai multe procedee şi anume:

— Prin metoda impresiunilor (amprentelor) potrivit căreia se face întîi o secţiune a organului, apoi se aplică lama pe suprafaţa de secţiune, fără a executa nici o mişcare suplimentară, în aşa fel încît pe suprafaţa lamei să rămînă impresiunea (amprenta) suprafeţei de secţiune a organului.

— Prin ştergere (cu suprafaţa de secţiune a organului aplicată pe lamă se face o mişcare de ştergere).

— Prin strivire între două lame: metodă care este folosită pentru executarea frotiurilor din leziuni de tip nodular, cum sînt cele produse de bacilul tuberculozei şi constă în depunerea unui nodul pe suprafaţa unei lame urmată de compresarea acestuia cu ajutorul altei lame.

— Prin depunere cu pipeta Pasteur sau cu ansa: metodă care se foloseşte în cazul organelor foarte bogate în sînge sau a materialelor patologice lichide sau vîscoase (lichid pleural, exsudate, puroi etc.). Se aspiră din organ cu pipeta Pasteur materialul patologic sau acesta se recoltează cu ochiul ansei de însămînţare, după care se depune şi se întinde pe lamă.

Pentru evitarea contaminării în timpul executării frotiurilor din organe este necesar ca executantul să nu se murdărească atingîndu-se de organe, iar marginile frotiului să nu atingă marginea lamei.

Indiferent de metoda aplicată, pentru a obţine imagini microscopice clare este de dorit ca frotiurile să fie cît mai subţiri.

Pipeta Pasteur şi acul de însămînţare sînt instrumentele cu care în mod curent se manipulează materialul microbian.

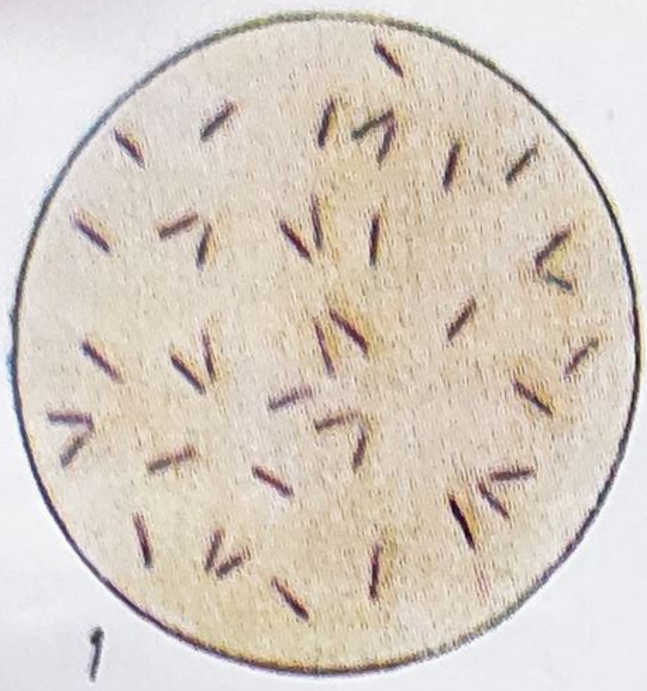
Acul de însămînţare este format dintr-o tijă metalică, avînd la o extremitate un mîner, confecţionat dintr-un material rău conducător de căldură şi la cealaltă extremitate un fir metalic de preferinţă din platină. Extremitatea liberă a firului metalic poate fi dreaptă (ac drept) sau răsucită în aşa fel încît să formeze un ochi cu diametrul reglabil. În acest caz, pentru acul de însămînţare se folosesc şi termenii de ansă sau oeză. De regulă se utilizează un ochi cu diametrul de 2—3 mm. Grosimea firului metalic depinde de specia bacteriană pe care o manipulăm mai frecvent. Firele cel mai des folosite au diametrele: 0,1—0,2 mm; 0,3—0,06 mm şi 1—1,5 mm. În unele cazuri, sînt folosite fire metalice mai groase, avînd extremitatea lăţită sub forma unei spatule (ac spatulat).

Pipeta Pasteur se confecţionează din ţeavă de sticlă fuzibilă astfel: ţeava se secţionează cu o pilă în bucăţi de aproximativ 40 cm lungime şi fiecare bucată se astupă la ambele extremităţi cu dopuri de vată. Fragmentele de ţeavă se sterilizează prin căldură uscată, în cuptor Pasteur, la 180°C, timp de o oră. Din fiecare bucată se trag la o flacără puternică cîte 2 pipete Pasteur.

Executarea frotiului din culturi. Se procedează în felul următor:

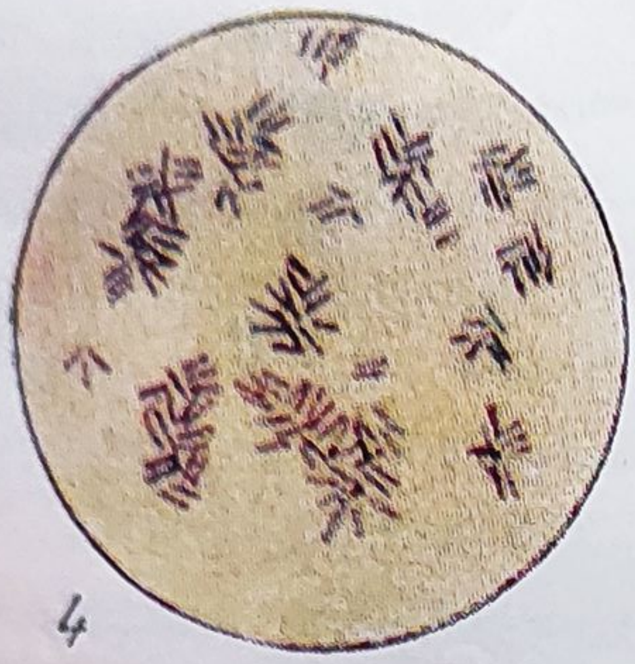
— Din culturi în medii lichide se ia o picătură de cultură, fie cu un ac de însămînţare, fie cu o pipetă Pasteur şi se depune în mijlocul lamei. Lichidul este apoi întins într-un strat uniform mai subţire sau mai gros, după densitatea probabilă a bacteriilor din lichidul de examinat.

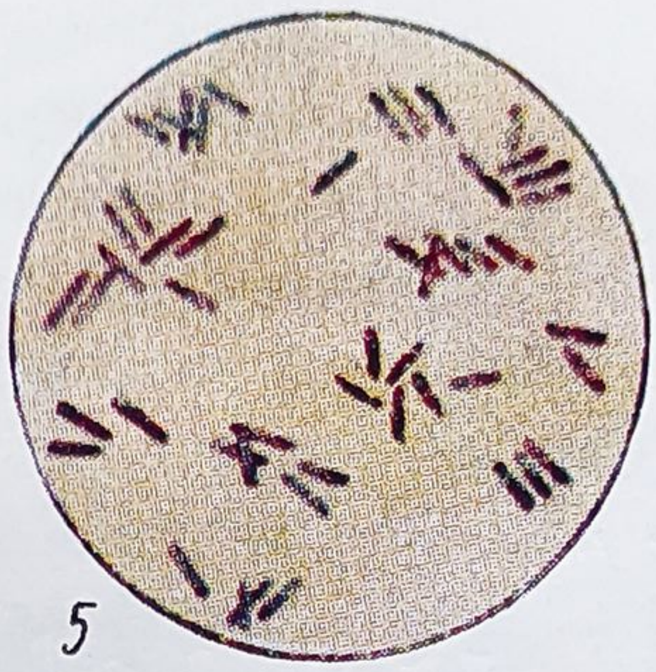
— Din culturile pe medii solide frotiul se face punînd în prealabil pe lamă o picătură de soluţie cloruro-sodică


1

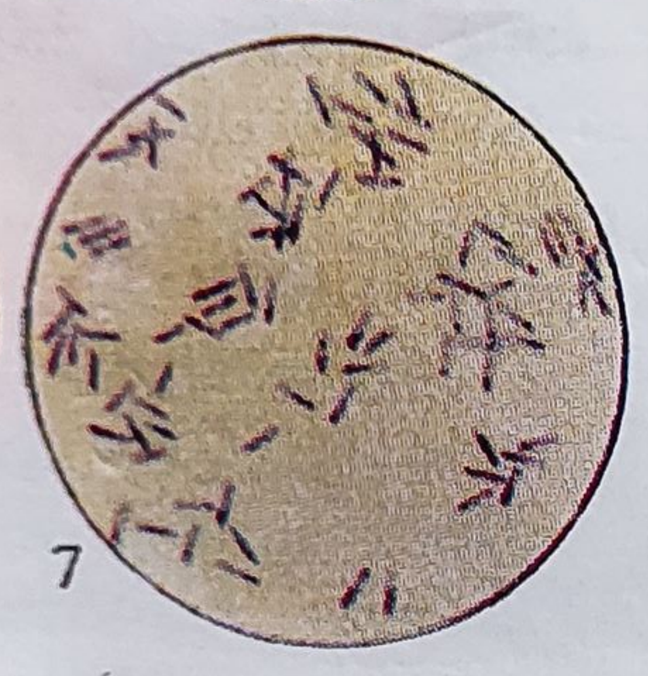
2

3

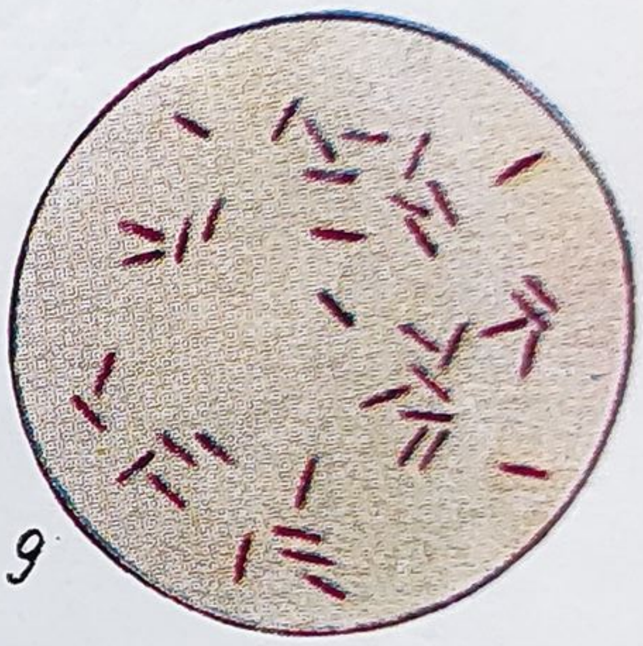

4

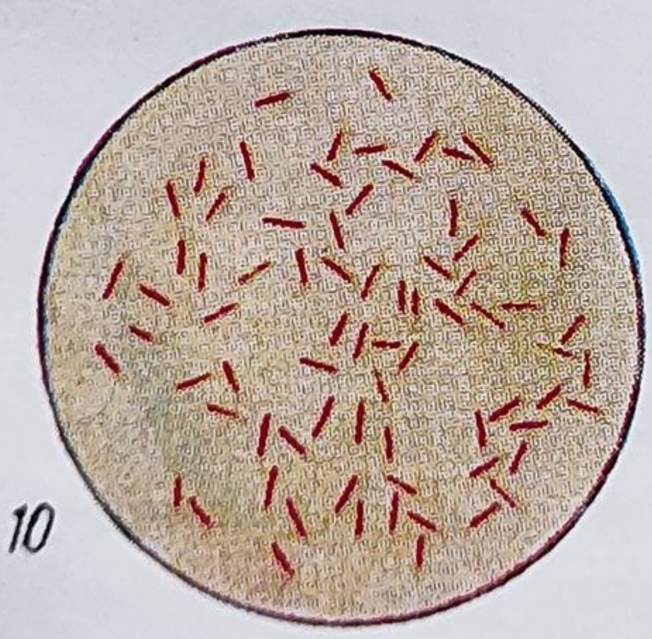

5

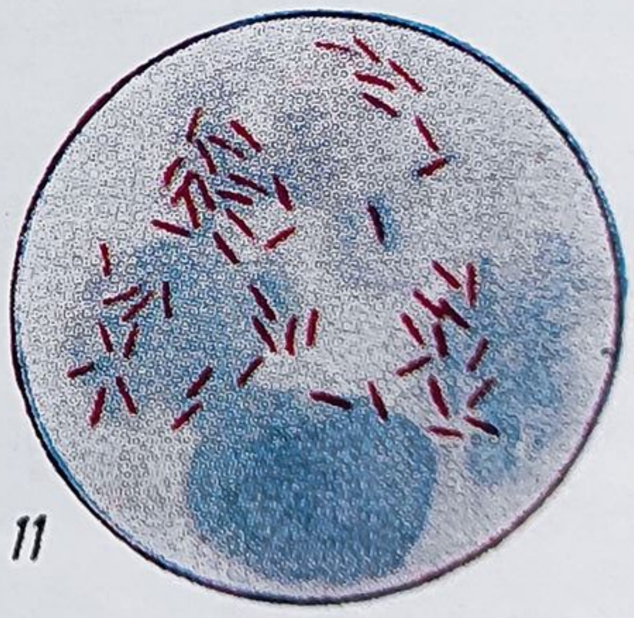
6


7

8


9


10


11

PLANȘA III — Bacili Gram pozitivi nesporulați:

1–2 — *Erysipelothrix insidiosa*, colorație Gram; *1* — frotiu din cultură; *2* — frotiu din organ; *3* — *Listeria monocytogenes*, colorație Gram, frotiu din cultură; *4* — *Corynebacterium pyogenes*, colorație Gram frotiu din cultură; 5–6 — *Corynebacterium equi*, colorație Gram: *5* — frotiu din cultură în bulion; *6* — frotiu din cultură pe agar; *7* — *Corynebacterium renale*, colorație Gram, frotiu din cultură; 8–9 — *Actinomyces bovis*, colorație Gram: *8* — frotiu din puroi; *9* — frotiu din cultură; 10–11 — *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, colorație Ziehl-Neelsen; *10* — frotiu din cultură; *11* — frotiu din organ

izotonică sau apă de robinet după care materialul bacterian recoltat cu ansa se depune în picătura respectivă, executîndu-se o suspensie uşor opalescentă.

Din culturi în profunzimea mediilor solide frotiul se execută la fel, materialul microbian recoltîndu-se fie cu acul de însămînţare, fie cu pipeta Pasteur, la care se adaptează în prealabil un tub de cauciuc, prin care se aspiră în aşa fel ca cel ce recoltează materialul să poată vedea felul în care manipulează pipeta în profunzimea mediului. Acest procedeu este necesar pentru a putea recolta materialul microbian din coloniile izolate care se găsesc în diferite puncte ale mediului şi se utilizează mai ales pentru executarea frotiurilor din culturi în geloza Veillon.

După executarea frotiurilor, în funcţie de metoda de colorare utilizată, ele se fixează sau rămîn nefixate în cazul prezenţei substanţei fixatoare în soluţia colorantă (de ex., metoda Giemsa).

Fixarea frotiului are ca scop realizarea unei adeziuni a germenilor de suprafaţa lamelor, pentru a nu fi spălaţi de diferite soluţii folosite pentru colorare. Fixarea frotiului nu se face decît după uscarea acestuia. Frotiurile umede nu trebuie fixate, datorită faptului că agenţii fixatori pot produce modificări ale formei bacteriilor. Există multiple procedee de fixare, fiind utilizate în mod curent următoarele:

Fixarea prin căldură (tehnica lui Koch) se face trecînd frotiul uscat de trei ori prin flacăra unui bec de gaz sau a unei lămpi de alcool cu faţa opusă celei pe care este întins materialul microbian. Trecerea nu se face nici prea repede, nici prea încet, ci „cu viteza cu care se taie pîinea cu un cuţit“ (este expresia consacrată prin uzaj).

Fixarea prin alcool flambare se face punînd pe frotiul uscat 1—2 picături de alcool etilic ori metilic sau din soluţia de alcool-acetonă, care se găseşte în bateria cu co-

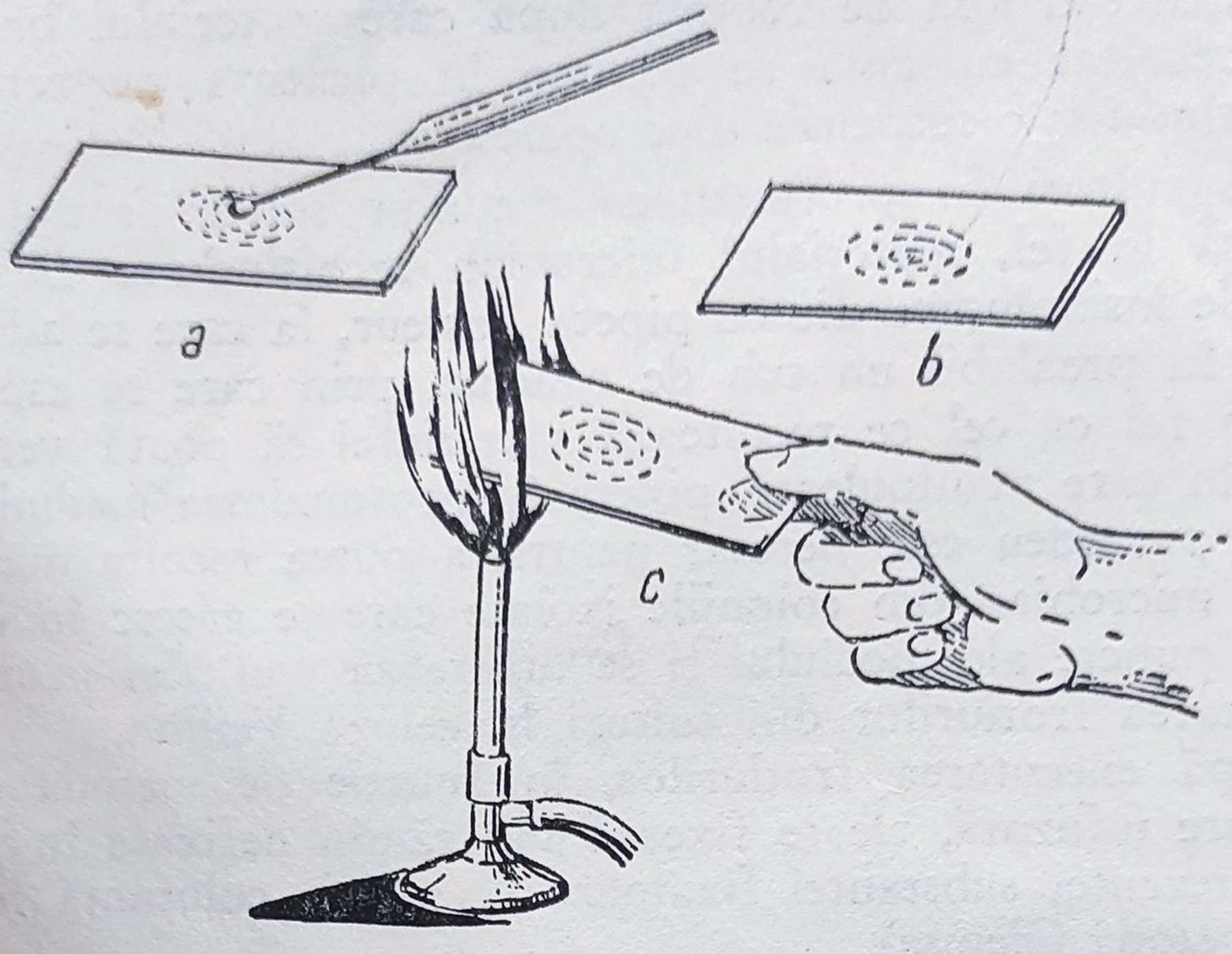


Fig. 8 — Timpii de executare a frotiului din culturi:
a — etalarea; *b* — uscarea; *c* — fixarea

loranți, direct peste materialul microbian întins, apoi se aprinde cu becul de gaz sau cu un chibrit, alcoolul arzînd în cîteva secunde.

Fixarea cu lichide fixatoare (alcoolul etilic, amestecul de alcool etilic și eter, alcoolul metilic) se face acoperind frotiul cu cîteva picături dintr-unul din aceste lichide și lăsîndu-se pînă la evaporarea totală a acestuia.

METODE DE COLORARE A CELULELOR VEGETATIVE ÎN FROTIURI

Colorarea simplă cu albastru de metilen. Se face cu soluția de albastru de metilen Löffler. Această soluție se prepară din:

— albastru de metilen crist. . . . . 1 g
— fenol pur crist. (lichefiat) . . . . . 2 ml
— alcool 96° . . . . . 10 ml
— apă distilată . . . . . 100 ml

Se mojarează substanţa colorantă şi se amestecă cu alcool. Se adaugă fenolul şi o parte din apa distilată, apoi se toarnă într-o sticlă cu dop şlefuit. Se spală mojarul cu restul de apă şi se adaugă în sticlă. Se ţine sticla timp de 24 de ore la 37°C, apoi se filtrează şi se poate utiliza.

Tehnica de colorare: frotiul fixat şi răcit se acoperă cu soluţia colorantă, care se ţine 2—5 minute, după care colorantul se varsă, frotiul se spală bine cu apă şi se usucă.

Pentru uscarea frotiurilor este bine să se folosească hîrtia de filtru sau sugativa şi nu încălzirea la becul de gaz pentru a evita formarea precipitatelor de colorant.

Rezultatul colorării: bacteriile apar colorate în albastru uniform. Această metodă permite şi observarea unor particularităţi morfologice ale bacteriilor cum ar fi capsula, ce se colorează în roz pal, sau sporul, care apare sub forma unei vacuole.

Metodele complexe de colorare, pe lîngă caracterele morfologice arătate anterior, ne dau încă un indiciu foarte preţios pentru identificarea genurilor şi speciilor bacteriene şi anume afinitatea tinctorială a germenilor examinaţi.

Prin afinitate tinctorială se înţelege capacitatea diferită a bacteriilor de a fixa şi a reţine anumiţi coloranţi chiar în condiţiile spălării cu diverse soluţii decolorante.

Dintre metodele complexe cele mai mult folosite sînt:

Colorarea după metoda Gram. Metoda a fost imaginată de Gram în anul 1884.

Soluţii necesare: violet de genţiana, Lugol, alcool-acetonă şi fucsină diluată.

— Soluţia de violet de genţiana are următoarea compoziţie:

— violet de genţiana pulvis	1 g
— fenol pur crist. (lichefiat)	2 ml
— alcool 96°	10 ml
— apă distilată	100 ml

Violetul de genţiana se amestecă cu alcool într-un mojar. Se adaugă apa distilată în care s-a dizolvat în prealabil fenolul, se omogenizează bine, se lasă pînă a doua zi şi se filtrează.

— Soluţia Lugol are rol de mordant şi se prepară astfel: 2 g iodură de potasiu şi 1 g iod metalic, se amestecă cu cîţiva ml apă distilată. Se agită sticla pînă la completa dizolvare a celor două substanţe şi apoi se adaugă apa pînă la completarea volumului de 300 ml. Soluţia se poate păstra ani de zile.

— Soluţia de alcool-acetonă este un lichid decolorant constituit din 3 volume alcool etilic de 96° şi un volum acetonă.

— Soluţia de fucsină diluată 1/10 are următoarea compoziţie:

— soluţia de fucsină Ziehl	10 ml
— apă distilată	90 ml

Tehnica colorării: frotiul uscat şi fixat se acoperă cu violet de genţiana sau cu cristal violet, se ţine un minut, după care soluţia se varsă.

— Frotiul se acoperă cu soluţia Lugol, care se ţine tot un minut, apoi se varsă; în cazul frotiurilor mai groase sau al celor din organe ori lichide organice, sau în cazul folosirii unei soluţii de cristal violet care precipită cu uşurinţă, frotiul poate fi spălat cu apă după vărsarea violetului de genţiana.

— Frotiul se spală cu alcool-acetonă un timp care variază în raport cu grosimea frotiului şi natura germenu-

lui. Justa apreciere a timpului de spălare cu alcool-acetonă se capătă prin practică. Este timpul cel mai sensibil al tehnicii de colorare, care cauzează majoritatea erorilor.

— După vărsarea soluţiei de alcool-acetonă, frotiul se spală bine cu apă.

— Frotiul se acoperă cu soluţia de fucsină diluată, care se ţine 10—30 secunde. Colorantul se varsă, frotiul se spală bine cu apă, se usucă şi poate fi examinat.

Rezultatul colorării: în urma colorării prin metoda Gram, germenii aparţinînd unor specii bacteriene apar coloraţi în albastru-violet, iar germenii aparţinînd altor specii bacteriene apar coloraţi în roşu. Modul diferit de colorare a germenilor prin această metodă se explică prin aceea că unele specii bacteriene fixează violetul de genţiana în aşa fel încît nu sînt decolorate de soluţia de alcool-acetonă, iar alte specii bacteriene nu au capacitatea de a reţine violetul de genţiana sub acţiunea decolorantă a soluţiei de alcool-acetonă. Capacitatea de a reţine sau nu violetul de genţiana sub acţiunea alcool-acetonei se datoreşte compoziţiei chimice diferite a peretelui celular.

Bacteriile care se colorează în albastru-violet prin metoda Gram sînt denumite Gram pozitive, iar cele colorate în roşu, Gram negative. Denumirea de colorant Gram este utilizată pentru soluţia de violet de genţiana. Gram pozitivitatea este deci capacitatea de reţinere a violetului de genţiana, gramnegativitatea indică lipsa acestei proprietăţi. Ultimul timp al colorării (recolorarea cu fucsina diluată) este necesar punerii în evidenţă a bacteriilor Gram negative. Metoda Gram, după tehnica descrisă mai sus, este denumită în unele cărţi de tehnică bacteriologica şi metoda Gram dublu. În acest caz, prin metoda Gram simplu se înţelege o metodă care merge pînă la

decolorarea cu alcool-acetonă, neutilizînd fucsina diluată pentru recolorarea bacteriilor Gram negative.

Printre bacteriile Gram pozitive există diferenţe în ce priveşte capacitatea reţinerii violetului de genţiana în urma tratării cu alcool-acetonă. Există bacterii care se decolorează greu şi altele care se decolorează uşor. Pentru acestea din urmă se foloseşte şi termenul de Gram labile. Grampozitivitatea este influenţată şi de vîrsta germenilor. În culturile vechi numeroase bacterii Gram pozitive devin mai uşor decolorabile sub acţiunea soluţiei de alcool-acetonă.

Colorarea bacteriilor acido-rezistente prin metoda Ziehl-Neelsen. Bacteriile acido-rezistente, cum este bacilul tuberculozei, datorită unei anumite structuri chimice, se colorează mai greu prin metoda Gram, folosindu-se pentru această grupă de germeni metoda Ziehl-Neelsen.

Soluţii necesare: soluţia de fucsină Ziehl; soluţia de acid sulfuric; soluţia de albastru de metilen.

Soluţia de fucsină Ziehl are următoarea compoziţie:

— soluţie alcoolică saturată de fucsină bazică (8—9 g substanţă la 100 ml alcool) . . . . 10 ml
— apă distilată fenicată 5% . . . . 100 ml

Soluţia se filtrează şi poate fi păstrată ani de zile.

— Soluţia de acid sulfuric în proporţie de 1 g la 4 g apă. În mod practic, o astfel de soluţie se obţine amestecînd 11 ml acid sulfuric cu 81 ml apă. Amestecul se face adăugînd acidul sulfuric, picătură cu picătură în apă, şi nu invers.

— Soluţia de albastru de metilen Löffler este identică cu cea folosită şi la colorarea simplă cu albastru de metilen.

Tehnica colorării: frotiul uscat şi fixat se acoperă cu soluţia de fucsină Ziehl; frotiul se pune pe o platină de

încălzit şi se încălzeşte cu flacăra becului de gaz pînă la apariţia vaporilor; se menţine în felul acesta sub emisiunea continuă de vapori timp de 5 minute. În timpul încălzirii, trebuie să se aibă în vedere ca încălzirea să nu provoace fierberea colorantului pe lamă şi ca pe măsura evaporării acestuia să se adauge fucsină Ziehl, în aşa fel ca frotiul să fie în permanenţă acoperit cu colorant; atît fierberea cît şi uscarea frotiului în timpul colorării provoacă precipitarea colorantului. După 5 minute colorantul se varsă.

— Frotiul se spală cu acid sulfuric, care are rol de decolorant; durata decolorării este în funcţie de grosimea frotiului. Se recomandă repetarea decolorării pînă cînd acidul sulfuric nu se mai colorează în galben, iar pe frotiu nu se mai observă colorant. După decolorare, frotiul se spală bine cu apă. Apoi se acoperă frotiul cu albastru de metilen Löffler, care se ţine timp de 1 minut, după care se varsă şi se spală bine frotiul cu apă. Se usucă şi poate fi examinat.

Rezultatul colorării: la examenul frotiului, germenii se pot prezenta fie coloraţi în roşu, fie coloraţi în albastru, în funcţie de specia bacteriană căreia îi aparţin. Speciile care prin această metodă se colorează în roşu se caracterizează prin rezistenţă faţă de acţiunea decolorantă a acidului sulfuric. Aceste specii sînt denumite acido-rezistente. Speciile bacteriene care apar colorate în albastru nu rezistă la acţiunea decolorantă a acidului sulfuric, ele sînt denumite neacido-rezistente, Acido-rezistenţa unor specii se datoreşte structurii chimice a peretelui celular bogat în lipoizi, care nu permit pătrunderea acidului sulfuric şi exercitarea acţiunii lui decolorante. Tot datorită acestei structuri chimice, coloranţii pătrund greu în celulele bacteriene. Din această cauză, speciile acido-rezistente nu se colorează prin metoda Gram obişnuită. În metoda Ziehl-Neelsen, pătrunderea colorantului este po-

sibilă datorită concentrației mari a soluției de fucsină Ziehl și acțiunii căldurii.

Acidorezistența sau neacidorezistența germenilor constituie un criteriu prețios pentru stabilirea unui diagnostic bacteriologic la fel ca și grampozitivitatea sau gramnegativitatea.

Colorarea în roșu sau albastru a germenilor, comună atît metodei Gram cît și metodei Ziehl-Neelsen, nu trebuie să ducă la confuzii în interpretarea rezultatelor, fiecare din metode punînd în evidență o altă proprietate.

Pentru bacteriile cu un grad mai redus de acidorezistență se folosesc diferite soluții decolorante mai puțin active în comparație cu soluția de acid sulfuric folosită în metoda Ziehl, cum sînt: acid sulfuric 1% (Fey și col., 1954), acid sulfuric 2% (Pier și col., 1958), acid clorhidric 3% (Hillermark, 1960) sau acid sulfuric 5% (Wielfuhr, 1961).

Astfel, pentru colorarea nocardiilor se recomandă metoda Ziehl-Neelsen, modificată în sensul unei decolorări timp de 5 minute cu acid sulfuric 1%.

Pe același principiu se bazează și colorarea rickettsiilor prin metoda Stamp.

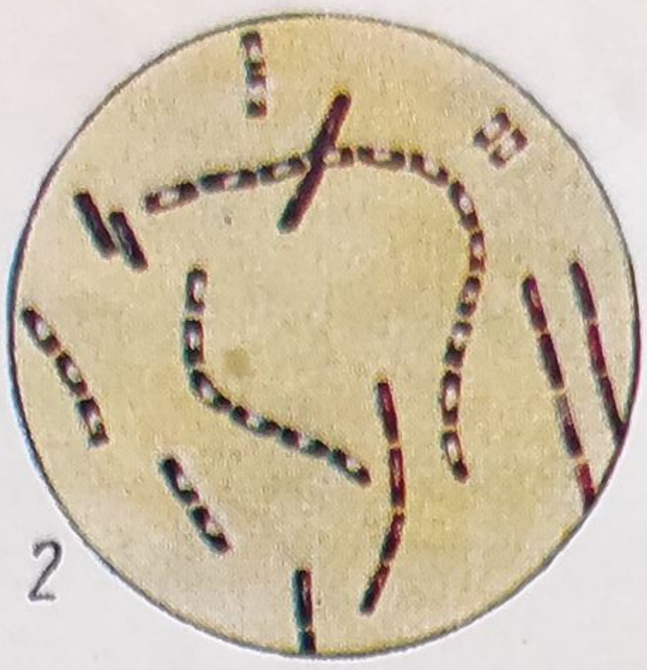
Coloraţia Stamp pentru rickettsii. *Soluţii necesare:*

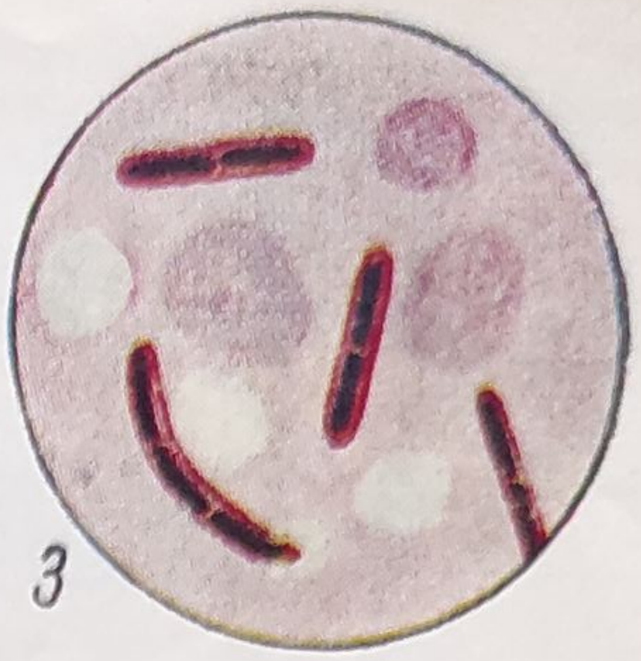
Soluția de fucsină Ziehl, diluată extempore 1/5, soluția de acid sulfuric 0,05%, soluția apoasă de verde de malachit 2%.

Tehnica de colorare: frotiul uscat și fixat la flacără se colorează cu fucsină Ziehl, diluată 1/5, timp de 8—10 minute.

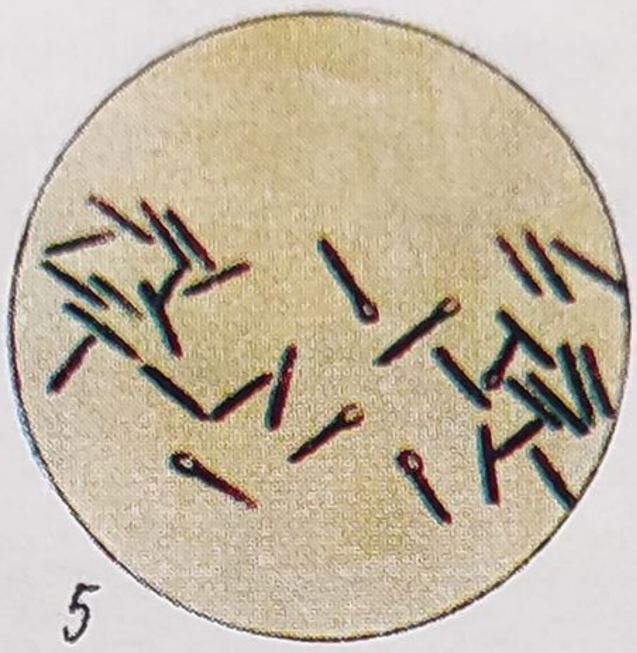
Se spală apoi cu apă de robinet și se decolorează cu acid sulfuric 0,05% timp de 2—3 secunde pînă la ușoara decolorare a frotiului. Decolorarea se recomandă să fie făcută într-un pahar Borrel. Aceeași soluție de acid sulfuric poate servi pentru 50—100 frotiuri.

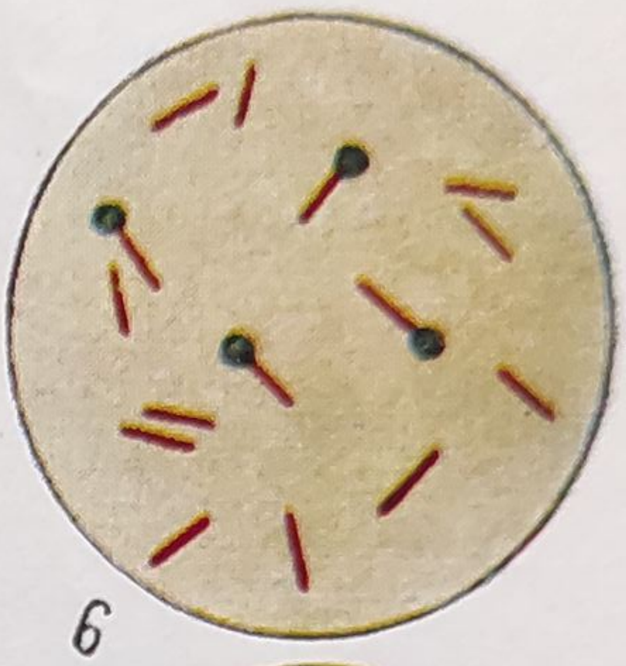
1


2

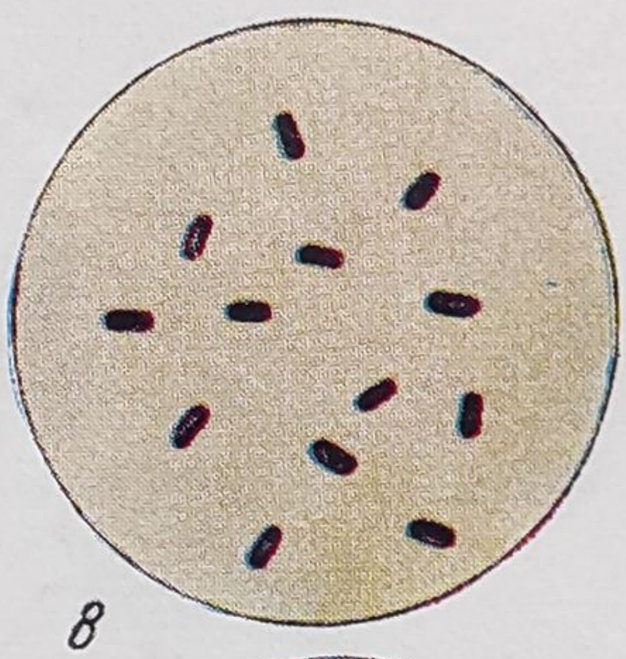

3

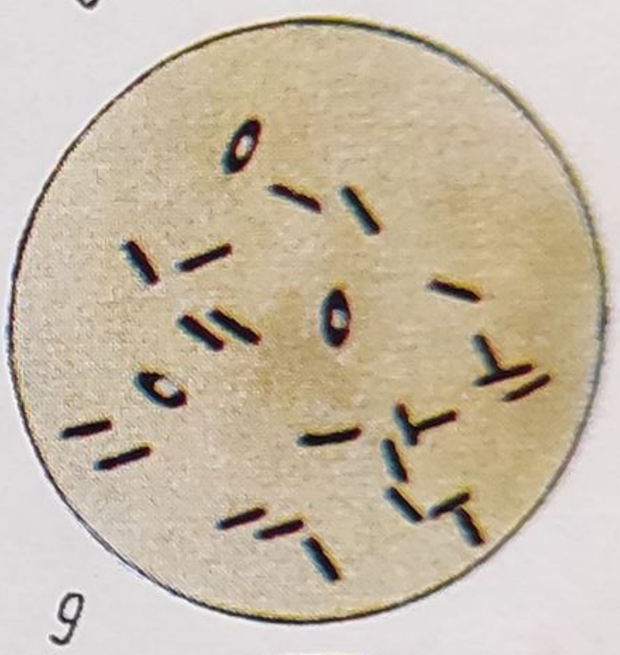
4

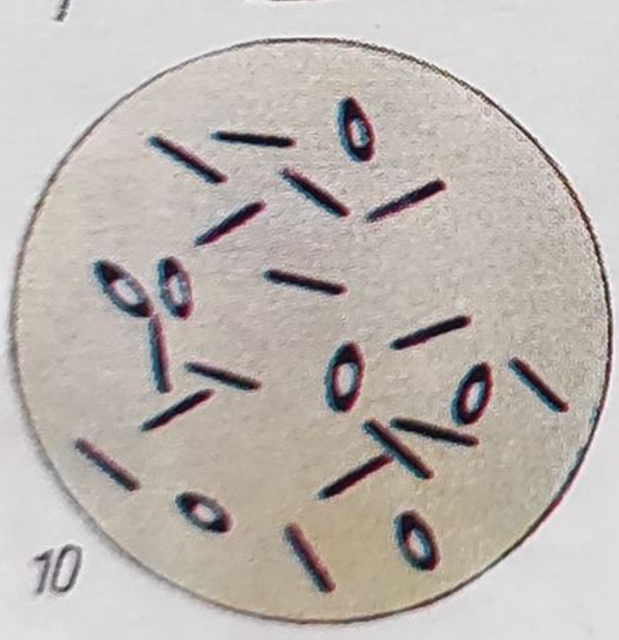

5


6

7


8


9


10

11

12

PLANȘA IV — Bacili Gram pozitivi sporulați și bacterii filiforme spiralate:

1–4 — *Bacillus anthracis*; *1* — marginea unei colonii examinate cu obiectivul 3; *2* — frotiu din cultură pe agar, colorație Gram; *3* — frotiu din organ, colorație Giemsa; *4* — frotiu din cultură în bulion, colorație Gram; 5–6 — *Clostridium tetani*, frotiu din cultură; *5* — colorație Gram; *6* — colorație cu verde de malachit; *7* — *Clostridium botulinum*, colorație Gram, frotiu din cultură; *8* — *Clostridium perfringens*, colorație Gram, frotiu din cultură; *9* — *Clostridium chauvoei*, colorație Gram, frotiu din cultură; 10–11 — *Clostridium septicum*, colorație Gram; *10* — frotiu din cultură; *11* — frotiu de pe suprafața ficatului de cobai, infectat experimental; *12* — *Leptospira*, colorație Fontana–Tribondeau, frotiu din cultură

Se spală apoi la un jet de apă şi se colorează 20—40 secunde cu soluţie de verde de malachit.

După recolorare se spală din nou la un jet de apă, se usucă şi se examinează.

Rezultat: rickettsiile apar colorate în roşu intens, iar celulele, proteinele tisulare şi eventualele bacterii, în verde pal.

Colorarea leptospirelor prin metoda de impregnare argentică Fontana-Tribondeau. Este o metodă specială pentru colorarea leptospirelor, care constă în impregnarea argentică a germenilor.

Soluţiile necesare sînt: lichidul Ruge, soluţia mordantă şi soluţia Fontana.

Lichidul Ruge:

— formalină	2 ml
— acid acetic glacial . .	1 ml
— apă distilată	100 ml

Soluţia mordantă:

— acid tanic	5 g
— fenol	1 g
— apă distilată	100 ml

Soluţia argentică Fontana:

— azotat de argint . . .	5 g
— apă distilată	100 ml

La 80 ml din soluţia argentică Fontana se adaugă soluţie concentrată de amoniac, picătură cu picătură. Se formează un precipitat brun, dens. Se adaugă amoniacul pînă ce precipitatul se dizolvă şi amestecul devine limpede. La acest amestec, se adaugă iar picătură cu picătură soluţia de nitrat de argint 5%, pînă cînd soluţia devine uşor opalescentă. Astfel pregătită, soluţia poate fi păstrată 1—2 luni.

Tehnica de colorare: frotiul uscat se acoperă cu lichidul Ruge pentru fixare şi se lasă astfel 5 minute, după care se repetă fixarea de 2—3 ori; se spală cu alcool; se

acoperă lama cu soluţia mordantă şi se încălzeşte pînă la apariţia vaporilor; se spală cu apă; se acoperă frotiul cu soluţia argentică Fontana; se încălzeşte la flacără pînă la apariţia vaporilor timp de 20—30 secunde (pînă ce frotiul ia un aspect metalic brun); se poate repeta impregnaţia cu soluţia argentică de 2—3 ori; se spală cu apă distilată; se usucă şi se examinează cu obiectivul de imersie.

Rezultatul colorării: leptospirele apar colorate în brun-negru, iar fondul în galben.

Metode de colorare a brucelelor. Metoda selectivă recomandată de O.M.S., cu fucsină. Această metodă se aplică mai ales pentru colorarea brucelelor din materiale patologice.

Soluţii necesare: soluţie de fucsină diluată 1/10; soluţie de acid acetic 0,5%; soluţie de albastru de metilen 1%.

Tehnica de colorare: frotiul se colorează timp de 1 minut cu soluţia de fucsină diluată; se face diferenţierea timp de 30 secunde cu soluţia de acid acetic; se spală frotiul prin acoperirea lamei cu apă distilată timp de 1—3 minute; se colorează cu albastru de metilen timp de 30 secunde; se spală cu apă distilată şi se usucă.

Rezultatul colorării: germenii din genul *Brucella* se colorează în roşu aprins, iar germenii aparţinînd altor genuri şi specii se colorează în albastru.

Metoda Koster. A fost preconizată de experţii de la F.A.O.—O.M.S. pentru punerea în evidenţă a brucelelor în produse patologice (în special în frotiuri din cotiledoanele placentare).

Soluţii necesare: soluţie de safranină, soluţie de acid sulfuric şi albastru de metilen.

— Soluţia de safranină:
  — safranină, soluţie saturată. . . . . 2 părţi
  — soluţie normală de NaOH . . . . . 5 părţi

  Soluţiile se amestecă în momentul folosirii.
— Acid sulfuric 0,1%
— Albastru de metilen fenolat (vezi pag. 219)

Tehnica colorării:

— soluţie safranină . . . . . 1 minut
— se spală cu apă
— se acoperă cu soluţie acid sulfuric . . 10—20 secunde
— se spală
— se ~~recoltează~~ recolorează cu albastru de metilen . . 2—3 secunde.

METODE DE COLORARE A SPORULUI

Colorarea cu verde de malachit (Schaeffer şi Fulton). *Soluţii necesare:*

— soluţia de verde de malachit 5%
— soluţia de safranină 0,5% sau soluţia de fucsină diluată.

Tehnica de colorare: frotiul uscat şi fixat se acoperă cu soluţia de verde de malachit şi lama se încălzeşte la flacără, ţinîndu-se sub emisie de vapori timp de 3 minute. Ca şi în cazul celorlalte colorări la cald trebuie să se completeze colorantul pe măsură ce se evaporă şi să nu se supraîncălzească lama, pentru a nu ajunge la fierberea colorantului.

Se spală apoi frotiul cu apă, se colorează cu safranină sau fucsină, se spală din nou, se usucă şi se examinează.

Rezultatul colorării: sporii apar coloraţi în verde, iar formele vegetative în roşu.

Colorarea cu fucsină (după Hansen). Soluţii necesare: fucsină (vezi pag. 222), acid acetic 5%, albastru de metilen.

Tehnica: fucsina se încălzeşte pînă la emisie de vapori şi se menţine 5 minute. Se decolorează cu acid acetic pînă cînd frotiul devine roz, se spală cu apă, se recolorează cu albastru de metilen, se spală, se usucă.

Metoda Giemsa. *Soluţii necesare:* soluţia Giemsa. Pentru prepararea soluţiei sînt necesare:

— azur II eozină	3	g
— azur II	0,8	g
— glicerină chimic pură	125	g
— alcool metilic chimic pur	375	g

Soluţia se prepară astfel: se încălzeşte glicerina la 60°C, se adaugă cele două substanţe colorante, care trebuie să fie perfect uscate şi pulverizate, amestecul se agită bine pînă la dizolvarea completă a pulberilor, se încălzeşte amestecul din nou la 60°C şi se adaugă apoi alcoolul metilic, se agită puţin şi, după 24 de ore la temperatura camerei, amestecul se filtrează prin hîrtie de filtru.

Tehnica colorării: frotiurile uscate, dar nefixate prin flacără sau alcool-flambare, se acoperă cu soluţia Giemsa în strat subţire, numărînd picăturile depuse pe lamă.

După 30—60 secunde, fără a vărsa soluţia Giemsa, se adaugă picătură cu picătură apă distilată sau bidistilată în proporţie egală sau de două ori în raport cu volumul de colorant iniţial. Inclinînd lama într-o parte şi alta se amestecă cît mai bine soluţia Giemsa cu apă distilată. După amestecarea cu apă distilată, soluţia se lasă timp de 3—5 minute, apoi se varsă, se spală bine, se usucă şi se examinează la microscop.

Capsula se colorează în diferite nuanţe de roz-violet, iar corpul bacterian într-un violet mai închis. De multe ori capsula nu se colorează diferenţiat de corpul bacterian şi în aceste cazuri prezenţa capsulei se deduce după mărimea diametrului transversal al germenului capsulat, mult mai mare decît al celulei bacteriene fără capsulă. Pentru a putea diferenţia mai bine capsula de corpul bacterian, trebuie folosită tot timpul observaţiei viza micrometrică.

Colorarea simplă cu albastru de toluidină. *Soluţia necesară:* albastru de toluidină.

— Soluţia are următoarea compoziţie:

— albastru de toluidină	0,5	g
— alcool etilic de 96°	10	ml
— acid fenic	3	g
— apă distilată sterilă pînă la . .	100	ml

Tehnica colorării: frotiul fixat prin flacără sau alcool-flambare, se acoperă cu soluţie de albastru de toluidină care se lasă pe lamă timp de 1—2 minute, se varsă, se spală, se usucă şi urmează să fie examinat.

Rezultatul colorării: capsula apare colorată în roz şi corpul bacterian în albastru.

Colorarea simplă cu albastru de metilen. Colorarea cu albastru de metilen permite şi punerea în evidenţă a capsulei, care se colorează în roz pal, iar corpul bacterian în albastru.

Colorarea negativă cu tuş de China. *Soluţiile necesare:* tuş de China; soluţie de albastru de metilen Löffler.

Tehnica colorării: pe o lamă se pune o picătură de ser fiziologic în care se face o suspensie din germenii de examinat, alături se depune o picătură de tuş de China; după ce s-a obţinut suspensia dorită, se amestecă cu tuşul de China şi se omogenizează bine.

Din amestecul de suspensie bacteriană şi tuş de China cu ajutorul unei lame şlefuite se fac mai multe frotiuri după tehnica executării frotiurilor din sînge.

Frotiurile se colorează timp de 1—2 minute cu soluţie de albastru de metilen Löffler; se varsă soluţia de albastru de metilen, se spală cu apă, se usucă.

Rezultatul colorării: la examenul microscopic se observă un fond negru, pe care bacilii apar coloraţi în albastru, între fond şi corpul bacterian observîndu-se o zonă clară,

necolorată, care corespunde spaţiului ocupat de capsulă. Datorită faptului că prin această metodă capsula nu se colorează şi se deduce existenţa ei prin prezenţa unui spaţiu clar, această metodă este denumită şi colorarea negativă a capsulei: este o metodă indirectă de punere în evidenţă a capsulei.

Dintre metodele expuse se poate considera colorarea cu soluţia Giemsa, ca metoda devenită clasică. Metodele simple cu albastru de metilen şi albastru de toluidină dau rezultate foarte bune numai în cazul frotiurilor executate din organe scurt timp după moarte. Metoda de colorare negativă se aplică pentru punerea în evidenţă a capsulei germenilor din specia *Clostridium perfringens* şi a germenilor capsulaţi din culturi.

METODE DE COLORARE A CILILOR

Colorarea după metoda Casares Gill.

Soluţii necesare: o soluţie mordantă şi fucsină Ziehl.

Prepararea soluţiilor: soluţia mordantă se prepară astfel: într-un mojar se dizolvă 10 g tanin şi 18 g clorură de aluminiu hidratată în 33 ml alcool de 70°. Într-un alt mojar, se dizolvă 10 g clorură de zinc şi 1,5 g fucsină bazică, în 10 ml apă distilată. Cele două soluţii se amestecă, vărsînd picătură cu picătură cea de a doua soluţie în prima. Soluţia mordantă poate fi păstrată ani de zile la rece şi întuneric.

Tehnica colorării: pe o lamă bine curăţată şi degresată se pune o picătură de ser fiziologic în care se execută suspensia de germeni, omogenizînd încet, pentru a nu desprinde cilii care sînt foarte fragili. Apoi se lasă să se usuce. În vederea obţinerii unor imagini mai clare se recomandă suspendarea germenilor în apă distilată şi ţinerea lor la 37°C timp de aproximativ 2 ore înainte de execu-

tarea frotiului. Se acoperă frotiul cu soluţia mordantă diluată în felul următor: o parte mordant pentru patru părţi apă distilată; amestecul se agită bine şi se trece prin hîrtie de filtru, filtratul fiind depus direct pe lamă. Mordantul rămîne pe lamă pînă ce pe suprafaţa sa apare un luciu metalic, apoi se varsă. Frotiul încă umed se acoperă cu soluţia de fucsină Ziehl care se lasă 1—2 minute, se varsă, se spală cu apă, se usucă şi se examinează.

Rezultatul colorării: corpii bacterieni apar colorați în roşu, iar cilii în roz pal.

Colorarea prin metoda Leifson:

Soluţiile necesare: fucsină bazică (soluţie 1,2% în 95% alcool etilic), soluţie acid tanic (3% în apă distilată) şi soluţie clorură de sodiu (1,5%). Ultimele două soluţii să fie lipsite de orice impuritate. Soluţia stoc se face amestecînd cantităţi egale din cele trei ingrediente şi se păstrează la frigider.

Tehnica: se acoperă frotiul cu 1 ml din soluţia colorantă şi se lasă 5—15 minute (depinde de vechimea soluţiei şi temperatura laboratorului). În acest timp se formează precipitate din cauza evaporării alcoolului. Cînd precipitatele schimbă culoarea, colorantul se îndepărtează prin spălare. După spălare se usucă la aer.

Rezultat: cilii se colorează în roz sau roşu şi corpul bacteriei poate fi necolorat sau colorat roz pal.

DETERMINAREA DIMENSIUNILOR BACTERIILOR

Pentru aprecierea dimensiunilor bacteriilor se pot folosi mai multe metode:

Metoda comparării cu elemente de dimensiuni cunoscute. De regulă, compararea se face cu eritrocite, al căror diametru este de 7,7—8 microni. Se amestecă în acest scop material bacterian cu o picătură de sînge proaspăt. Din amestec se execută frotiuri care se colorează şi se exa-

minează. Această metodă are un grad mare de aproximaţie şi nu poate fi folosită decît cu caracter orientativ.

Metoda măsurării cu micrometrul ocular. Această metodă are un grad de aproximaţie mai mic şi se recomandă în cazurile cînd sînt necesare aprecieri mai exacte. Micrometrele sînt constituite din discuri de sticlă pe care sînt gravate scări gradate. Pentru o determinare sînt necesare întotdeauna două micrometre: un micrometru obiectiv şi un micrometru ocular.

Tehnica de lucru: se deşurubează lentila superioară a sistemului ocular şi se introduce micrometrul ocular cu faţa gravată în jos; apoi lentila superioară a ocularului se înşurubează la loc. Pe platina microscopului se aşază micrometrul obiectiv şi se examinează cu obiectivul de imersie, după ce în prealabil scara micrometrului a fost centrată cu un obiectiv uscat. Este bine să se lucreze cu microscoape al căror tub are lungimea de 160 mm, iar în cazul microscoapelor cu lungimea tubului reglabilă se recomandă ca aceasta să se regleze tot la 160 mm. Micrometrul obiectiv se reglează astfel încît liniile zero ale celor două scări gradate să se suprapună. Apoi se observă şi se notează care din diviziunile celor două micrometre se suprapun. Valorile găsite la micrometrul obiectiv se înmulţesc cu 10 (valoarea în microni a unei diviziuni) şi se împart apoi la valorile corespunzătoare de pe scara micrometrului ocular.

De exemplu: din fig. 9 se vede că diviziunea 6 a micrometrului ocular se suprapune peste diviziunea 1 a micrometrului obiectiv. Ştiind că o diviziune a micrometrului obiectiv este egală cu 10 microni, reiese că cele 6 diviziuni ale micrometrului ocular corespund cu 10 microni, deci o diviziune a micrometrului ocular este $10 : 6 = 1{,}6$ microni.

Cifra obţinută reprezintă valoarea micrometrică a unei diviziuni din scara gradată a micrometrului ocular.

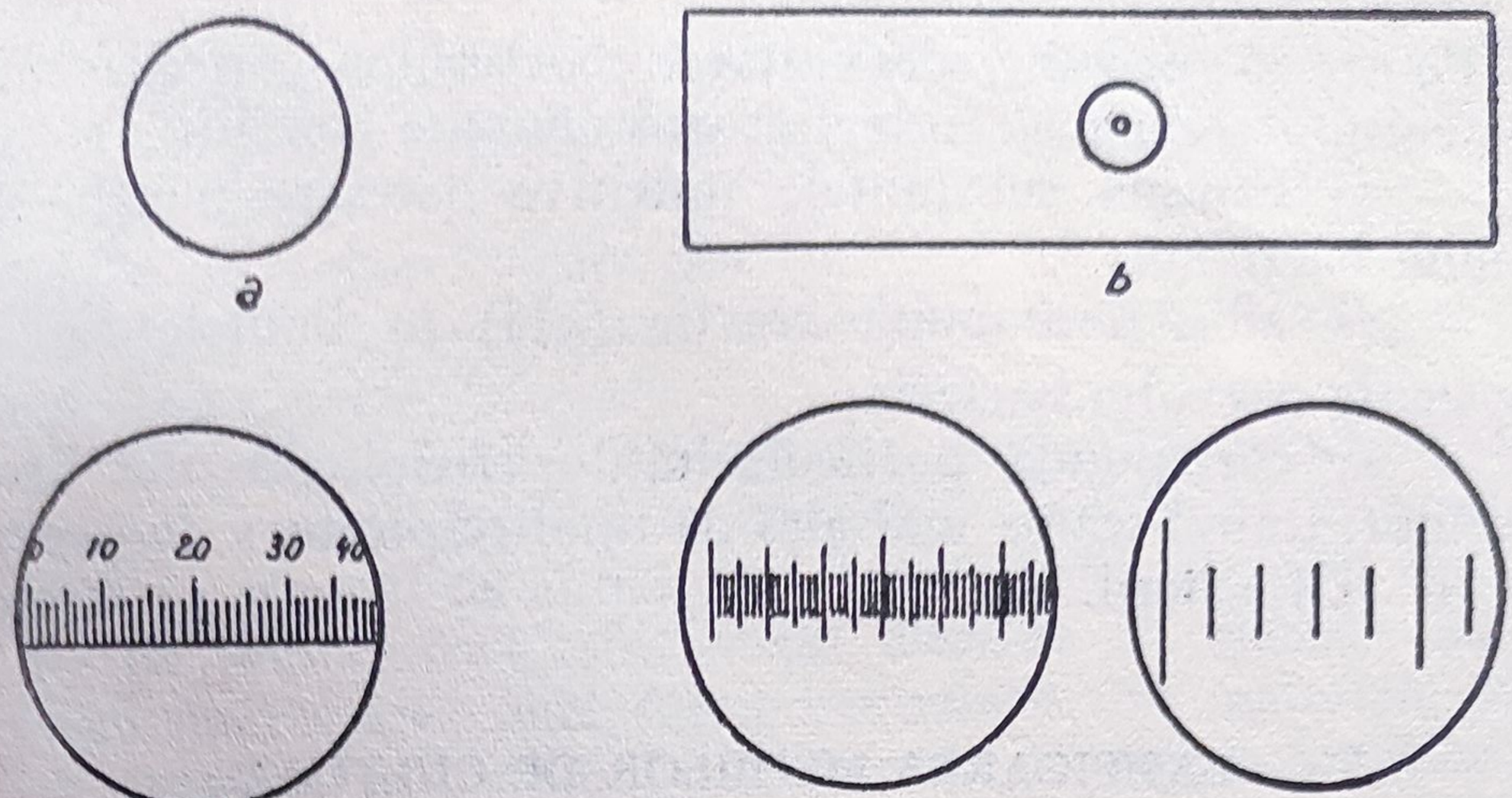


Fig. 9 — Determinarea dimensiunilor unei bacterii:
a — micrometru ocular; *b* — micrometru obiectiv; *c* — scara micrometrului ocular văzută după montare în ocular; *d* — scara micrometrului obiectiv văzută cu obiectivul 8; *e* — aceeaşi scară a micrometrului obiectiv văzută cu imersie; *f* — micrometrul ocular suprapus peste micrometrul obiectiv văzut cu imersie; *g* — micrometrul obiectiv înlocuit cu frotiul cu germenii de examinat

METODE DE CULTIVARE A BACTERIILOR

GENERALITĂŢI PRIVIND MEDIILE DE CULTURĂ

Marea majoritate a bacteriilor, cu excepţia rickettsiilor, se cultivă pe medii inerte.

Un mediu de cultură poate fi definit ca un suport nutritiv steril, care permite dezvoltarea şi studiul unui microb în afara nişei ecologice naturale.

Pentru a permite dezvoltarea bacteriilor, orice mediu de cultură trebuie să îndeplinească anumite condiţii:

— să conţină substanţele nutritive necesare metabolismului bacterian;

— să aibă o anumită reacţie (pH) în limitele căreia se poate dezvolta bacteria;

— să corespundă particularităţilor fiziologice ale bacteriilor, ţinînd seama mai ales de tipul respirator;

— să fie steril.

CLASIFICAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Pe baza diferitelor criterii privind compoziţia, consistenţa, natura ingredientelor, mediile se pot clasifica astfel:

1. Din punct de vedere al consistenţei:
   — medii lichide;
   — medii solide;
   — medii semisolide.

2. Din punct de vedere al tipului respirator al bacteriei cultivate:
   — medii pentru bacterii aerobe;
   — medii pentru bacterii anaerobe.

3. Din punct de vedere al compoziţiei:
   — medii naturale, care conţin elemente nutritive provenite din ţesuturi animale, vegetale ce se obţin prin extracţie apoasă sau hidroliză chimică sau enzimatică;
   — medii sintetice, care conţin numai compuşi cu structura chimică cunoscută, dozabili.

4. Din punct de vedere al scopului şi frecvenţei întrebuinţării:

a) Medii de uz curent — se folosesc curent în laborator pentru izolarea şi cultivarea bacteriilor (de ex., bulion şi geloză pentru bacterii aerobe).

b) Medii speciale — au întrebuinţare mai limitată şi la rîndul lor pot fi împărţite în mai multe grupe după scopul utilizării astfel:

Medii de izolare — care pot fi:

— elective — favorizează îndeosebi dezvoltarea speciei bacteriene căutate;

— selective — inhibă dezvoltarea bacteriilor asociate cu germenul a cărui izolare se urmăreşte (inhibarea este asigurată de adaosul de antiseptice, antibiotice, coloranţi etc.);

— de îmbogăţire — sînt medii elective şi selective asigurînd dezvoltarea unei specii bacteriene din materiale în care numărul germenilor este extrem de redus (paucibacilare);

— de conservare — medii sărace în substanţe nutritive, folosite în laboratoarele de bacteriologie pentru a menţine o cultură bacteriană în viaţă.

— Medii de identificare — deseori sînt sintetice sau semisintetice, conţinînd indicatori ce permit punerea în evidenţă a unor caractere biochimice sau de patogenitate ale bacteriilor.

În scopul examinării unor activităţi biologice speciale ale bacteriilor (de exemplu punerea în evidenţă a anumitor toxine), se folosesc drept medii culturile celulare.

Pentru cultivarea rickettsiilor (germeni care nu se dezvoltă pe medii inerte) după cum şi a altor bacterii, în anumite scopuri, se folosesc ouăle embrionate.

MEDII DE CULTURĂ

MEDII DE CULTURĂ UZUALE PENTRU BACTERIILE AEROBE

• **Bulionul.** Se prepară de obicei, din carne de cal sau bou, mai rar de găină, niciodată din cea de porc care este prea grasă.

Prepararea bulionului se face astfel: carnea proaspătă (muşchi), se curăţă de aponevroze, tendoane şi grăsime,

se taie în bucăţi mici sau se toacă prin maşina de tocat carne; la 500 g tocătură de carne se adaugă 1000 ml apă de robinet. Se ţine 24 de ore la rece pentru macerare, apoi se fierbe 30 minute, se decantează şi se stoarce, iar lichidul obţinut se filtrează prin vată şi se completează cu apă la volumul iniţial. Se încălzeşte la 80 — 90°C şi se adaugă peptonă 1—10 g şi NaCl 5 g la 1000 ml lichid. Peptona este un ingredient care se foloseşte la prepararea a numeroase medii de cultură şi se obţine prin digestia substanţelor proteice de origine animală sau vegetală. Compoziţia peptonei variază cu originea şi metoda de preparare. Se prezintă ca o pulbere gri-gălbuie, avînd un miros caracteristic, solubilă în apă, insolubilă în alcool.

Se adaugă NaOH n/1 pentru ajustarea pH-ului, în cantitatea stabilită prin metoda colorimetrică. Se încălzeşte la autoclav la 115°C timp de 15 minute. Încălzirea, în prezenţa NaOH, produce o precipitare abundentă; se filtrează prin hîrtie de filtru. Apoi se repartizează în tuburi, sticle sau baloane care se astupă cu dopuri de vată, se sterilizează 30 minute la autoclav la 115°C.

Bulionul sterilizat se conservă timp îndelungat la rece şi întuneric.

În funcţie de speciile bacteriene, a căror cultivare se urmăreşte, se prepară şi alte variante de bulion, dintre care, cele mai frecvent folosite, sînt bulionul Martin şi bulionul triptic.

Prepararea acestor medii nu este principial prea diferită de a bulionului. Deosebirea principală constă în înlocuirea peptonei cu preparate asemănătoare din punctul de vedere al structurii chimice. Astfel, în cazul bulionului Martin se foloseşte un extract de stomac de porc obţinut prin acţiunea HCl, iar în cazul bulionului triptic un extract de carne obţinut prin digestia acesteia sub acţiunea tripsinei.

În prezent, au o utilizare din ce în ce mai largă mediile preparate cu extract de carne. Sînt anumite firme (Merck,

Difco, Bacto etc.) ale căror produse au o largă răspîndire în întreaga lume şi care printre altele livrează astfel de extracte sub formă de pulberi purificate şi standardizate. Folosirea acestora asigură obţinerea unor medii de calitate superioară.

Agarul nutritiv sau geloza. Este un mediu solid preparat prin adăugarea fibrelor de agar ce se obţin dintr-o algă marină din mările Japoniei. Acest mediu a fost introdus în 1884 de Hess, elevul lui Koch, care a arătat avantajul mediilor gelozate faţă de gelatină, folosită pînă atunci ca mediu solid în bacteriologie. Fibrele de agar sînt de culoare albă-gălbuie, se dizolvă în apă la temperatura de 80—90°C, constituind un lichid vîscos, care se solidifică la temperatura de 45°C. Punctul de topire fiind diferit de cel de solidificare, acest mediu prezintă o serie de avantaje pentru bacteriologie. Fibrele de agar sînt lipsite de proprietăţi nutritive, servesc numai pentru solidificarea mediului.

Prepararea se face astfel: se taie fibrele de agar în fragmente mici şi se adaugă la bulionul preparat în prealabil, în proporţie de 17—30 g pentru 1000 ml bulion. Apoi se încălzeşte 30 minute la 120°C. Amestecul încă fierbinte se filtrează prin vată, se repartizează în tuburi sau baloane ce se astupă cu dopuri de vată, se sterilizează 20 minute la 120°C şi se solidifică în poziţie înclinată sau verticală.

Mediul preparat nu se poate păstra mult timp în laborator, deoarece prin evaporare se usucă.

Agarul moale. Este un mediu semisolid, se prepară la fel ca şi mediul descris mai sus, dar cantitatea de agar diferă, este de 2—5 g la 1000 ml bulion. Mediul se foloseşte pentru cultivarea şi conservarea bacteriilor.

Medii cu ser. Se prepară din medii uzuale (bulion, agar), la care se adaugă ser normal, de obicei de cal, în proporţie de 1/10. Sîngele necesar obţinerii serului se recoltează în mod aseptic în baloane sterile prevăzute cu baghete de sticlă, aşezate încrucişat. După coagularea sîngelui, serul se

decantează în condiţii sterile. Se face controlul sterilităţii serului şi în cazul cînd nu este steril se filtrează (Seitz EK). Pentru prepararea agarului cu ser, mediul trebuie în prealabil topit, apoi se lasă să se răcească la 45°C, se adaugă serul, se omogenizează şi se lasă să se solidifice în poziţia dorită. După adăugarea serului, mediile se controlează din punctul de vedere al sterilităţii, ţinîndu-le la termostat 24 de ore.

Medii cu sînge. Se recoltează sînge steril în balon cu perle de sticlă pentru defibrinare şi se poate păstra la frigider 2—3 săptămîni. Pentru medii solide se adaugă în proporţie de 5—10% la agar topit şi răcit, pentru medii lichide se adaugă la 9 ml bulion, 0,2—3 ml sînge.

Medii glicerinate. Din această categorie se întrebuinţează în mod curent, bulionul glicerinat, agarul glicerinat şi cartoful glicerinat.

Bulionul şi agarul glicerinat se pregătesc prin adăugarea glicerinei în proporţie de 1% la mediile uzuale. Sterilizarea se face la 110°C timp de 20 minute.

Cartoful glicerinat se pregăteşte astfel: se aleg cartofi de bună calitate, de preferinţă săpunari, din care se scot bucăţi cilindrice, cu ajutorul dispozitivului lui Queyrat. Cilindrii obţinuţi se curăţă de coajă şi se secţionează pe diagonală, rezultînd astfel cîte 2 felii de fiecare cilindru. Acestea se spală în apă şi se ţin 3 ore într-un vas cu soluţie 1% carbonat de sodiu, deoarece au o reacţie slab acidă. Fiecare felie se introduce apoi în cîte un tub Roux. Felia de cartof se opreşte la nivelul gîtuirii. Apoi se toarnă în tuburi bulion glicerinat 5% pînă la nivelul gîtuirii, în aşa fel ca partea inferioară a cartofului să fie umectată în permanenţă cu bulionul glicerinat. Mediile se sterilizează la 110°C timp de 20 minute.

Medii cu ou. Această categorie de medii este folosită pentru cultivarea germenilor aparţinînd speciilor *Mycobacterium tuberculosis*, *Pasteurella tularensis*, *Bacillus larvae*

etc. Exemple de medii cu ou folosite în vederea izolării bacilului tuberculozei sînt mediul Löwenstein, mediul Petragnani, mediul Dorset, mediul Petroff etc.

Mediul Löwenstein pentru cultivarea speciei Mycobacterium tuberculosis. Se prepară astfel: se pregăteşte o soluţie-mamă cu următoarea compoziţie:

— fosfat monopotasic	1 g
— citrat de sodiu	1 g
— sulfat de magneziu	1 g
— asparagină	3 g
— glicerină neutră	60 ml
— apă distilată	1 000 ml

Această soluţie se sterilizează în vapori de apă la 100°C, timp de 2 ore. Se poate păstra un timp îndelungat în laborator.

Pentru pregătirea mediului se amestecă într-un balon cu perle:

— soluţie-mamă	150 ml
— glicerină	12 g
— făină de cartof	6 g

Se omogenizează bine şi se încălzeşte, mai întîi la 100°C timp de 15 minute şi apoi la 56°C timp de 60 minute.

După încălzire se adaugă 5 ouă întregi şi un gălbenuş; se omogenizează şi se adaugă 5 ml verde de malachit soluţie apoasă 2%.

Mediul se filtrează prin tifon steril, se repartizează în tuburi, se coagulează şi se sterilizează prin tindalizare timp de 2 zile consecutiv, la temperatura de 80—85°C.

Agar cu ou şi glicerină. La agar topit şi răcit la 45—50°C se adaugă 3% glicerină sterilă şi un gălbenuş de ou recoltat steril, pentru fiecare 150 ml mediu. Recoltarea sterilă a gălbenuşului de ou se face astfel: se introduce oul în alcool etilic 80° pentru 30 minute, se secţionează la o extremitate coaja cu o foarfecă flambată, se elimină albuşul iar gălbenuşul se introduce direct în mediu. Se omogenizează

bine, se repartizează în condiţii sterile în tuburi, se lasă să se solidifice şi apoi se controlează sterilitatea prin incubare la 37°C timp de 24 ore.

Mediul se foloseşte pentru cultivarea bacilului tuberculozei şi a altor bacterii patogene. Pentru a-i mări calităţile nutritive se mai poate adăuga ser sanguin.

Mediul cu ou pentru Bacillus larvae. La agarul nutritiv obişnuit lichefiat şi răcit la 50°C se adaugă gălbenuş de ou recoltat în condiţii de perfectă asepsie în proporţie de 1/5. Se lasă apoi să se solidifice în poziţie înclinată.

MEDII PENTRU CULTIVAREA BRUCELELOR

Geloza glicero-glucozată (mediul Henry). La geloza nutritivă glicerinată 2%, după sterilizare şi răcire la 50°C se adaugă steril soluţie de glucoză 20% filtrată prin Seitz, astfel ca să se realizeze concentraţia finală 1%.

Geloza-ser-glucozată. La 95 ml geloză nutritivă topită şi răcită la 50°C, se adaugă steril 5 ml soluţie glucoză-ser 1 : 5 filtrată prin Seitz şi conservată la 4°C.

MEDII PENTRU IZOLAREA BACTERIILOR GRAM POZITIVE NESPORULATE (STREPTOCOCI, STAFILOCOCI, MICROCOCI, BACILUL RUJETULUI)

Agar cu azid de sodiu, cristal violet şi sînge. Compoziţie:

— bulion	500	ml
— triptoză	15	g
— clorură de sodiu	5	g
— agar-agar	18	g
— azid de sodiu	0,5	g
— cristal violet (sol. apoasă 0,1%)	2	ml
— apă distilată	1000	ml

Se ajustează pH 7, se sterilizează prin autoclavare 20 minute la 110°C. Se răceşte la 50°C, se adaugă 50 ml sînge

defibrinat sau citratat de bou și se toarnă în plăci Petri. Concentrația finală de azid este de 1:2000, iar de cristal violet 1:500 000.

Pe acest mediu, unele specii de streptococ, în special *Str. agalactiae*, absorb cristalul violet și coloniile se colorează în violet, iar hemoliza este mult mai evidentă decît pe agarul cu sînge obișnuit.

Pentru a obține un mediu selectiv în vederea izolării speciei *Erysipelothrix insidiosa* se mărește concentrația de azid de sodiu la 1:1000 și cea de cristal violet la 1:100 000.

Mediul selectiv Edward pentru izolarea streptococilor din lapte. Mediul lichid:

—bulion pH 7,4	950 ml
— ser steril de bou sau cal . . .	50 ml
— dextroză	10 g
— cristal violet q.s. -concentrație	1:200 000

Mediul solid:

— geloză nutritivă pH 7,4 . . .	1 000 ml
— sînge defibrinat de bou . . .	50 ml
— esculină	1 g
— cristal violet 0,1%	2 ml

Se pune esculina în puțină apă, se fierbe pentru solubilizare și apoi se adaugă cele trei ingrediente la agarul topit și răcit la 50°C. Cristalul violet inhibă stafilococii; coloniile de *E. coli* și bacterii înrudite sînt negre datorită reacției cu esculină, iar coloniile de *Str. agalactiae* sînt purpurii (roșu închis) prin absorbția cristalului violet.

MEDII PENTRU IZOLAREA ȘI EXAMINAREA UNOR PROPRIETĂȚI BIOCHIMICE ȘI DE PATOGENITATE ALE STAFILOCOCILOR

Agar hiperclorurat. La geloza nutritivă se adaugă clorură de sodiu astfel ca să se obțină o concentrație finală de 6,5%. Mediile hiperclorurate au o acțiune selectivă pentru stafilococi, pentru streptococii din grupa enterococilor, după cum și pentru alte bacterii halofile.

Mediul Chapman

Peptonă	10	g
Extract carne	8	g
Clorură de sodiu . . .	75	g
Manitol	10	g
Agar	15—20	g
Roşu fenol	0,025	g
Apă distilată	1 000	ml

pH=7,6 : sterilizare 20 minute la 110°C.

Mediul are culoare roşie; coloniile manito-pozitive virează culoarea mediului în galben, cele negative nu modifică culoarea mediului.

Mediul Baird-Parker. Mediu de bază:

— triptonă (peptonă din cazeină) .	1 %
— extract carne	0,5 %
— extract drojdie	0,1 %
— clorură de litiu	0,5 %
— agar	2 %

Ingredientele se dizolvă în apă, prin încălzire, pH-ul se ajustează la 6,8. Fără să se filtreze, mediul se repartizează în volume de 90 ml şi se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute. Se adaugă apoi în momentul folosirii la fiecare 90 ml mediu topit şi răcit la 45 — 50°C, următoarele soluţii preparate în prealabil şi filtrate:

— glicină 20%	6,3 ml
— telurit potasiu 1%	1 ml
— pyruvat sodiu 20%	5 ml

După omogenizare se adaugă 5 ml emulsie gălbenuş de ou, se omogenizează bine şi se toarnă cîte 10 ml în plăci de 9 cm sau 35 ml în plăci de 24 cm diametru.

După însămînţare se incubează 24 ore. Stafilococii formează colonii negre cu margine albă-cenuşie, înconjurată de o zonă clară care se extinde în mediul opac. Pentru inhibarea bacteriilor din genul *Proteus* se poate adăuga

sulfametazina (Smith A., Baird-Parker, 1964) înainte de autoclavare sau înainte de repartizarea mediului în plăci (în acest caz se filtrează soluția de sulfametazină preparată din 0,5 g sulfametazină dizolvată în 25 ml soluție n/1 de NaOH și apă distilată pînă la 250 ml).

Mediul Vogel-Johnson — mediu selectiv pentru stafilococi coagulazo- și manito-pozitivi.

— Peptonă din cazeină	10	g
— Extract drojdie	5	g
— Manită	10	g
— K_2HPO_4	5	g
— Clorură de litiu	5	g
— Glycol	10	g
— Roșu fenol	0,025	g
— Agar-agar	13	g
— Apă distilată	1000	ml

pH=7—7,4, sterilizare la 121°C.

Înainte de folosire, la mediul topit și răcit se adaugă 20 ml soluție 1% telurit potasiu sterilizat prin filtrare, se toarnă în plăci. Plăcile însămînțate se incubează 48 ore. Coloniile de stafilococi coagulazo-pozitivi sînt mici, negre pe mediul roșu. Dacă dezintegrează manita sînt înconjurate de o zonă galbenă.

MEDII PENTRU DIAGNOSTICUL DIFERENȚIAL AL ENTEROBACTERIACEELOR

Mediul cu albastru metil-eozină (mediul E.M.B. sau Levin). Compoziție:

— geloză nutritivă 2% pH 7,4 conținînd peptonă 10‰ și fosfat bipotasic anhidru 2‰	1 000 ml
— lactoză soluție 20%	50 ml
— eozină galbenă (Holborne) sol. 2%	20 ml
— albastru metilen 0,5%	13 ml

După topirea gelozei și răcire la 50°C se adaugă celelalte ingrediente sterilizate în prealabil. Se amestecă, se

toarnă în plăci Petri. Mediul are culoare roşie-violacee. Coloniile de *E. coli* apar negricioase cu luciu metalic, în timp ce coloniile celorlalte enterobacteriacee apar colorate roz spălăcit.

Mediul cu verde briliant. Compoziţie:

— bulion de carne peptonat cu pH 7,5	1 000 ml
— agar	25 g
— lactoză	15 g
— soluţie roşu fenol	40 ml
— soluţie verde briliant (0,5 g/100 ml)	1 ml
Soluţie roşu fenol: NaOH n/10	40 ml
roşu fenol	1 g
apă distilată	460 ml

Preparare: după dizolvarea agarului şi filtrare prin vată şi tifon se adaugă lactoza dizolvată în apă distilată, roşu fenol, verde briliant. Se agită, se repartizează în diferite recipiente, se sterilizează 30 minute la 110°C. Mediul este colorat în roşu brun, avînd pH-ul 7,2—7,3. Coloniile bacteriilor lactozo-pozitive apar colorate în galben-verzui, cele lactozo-negative în roz.

Geloza Mac Conkey

— Peptonă Bacto	17	g
— Proteoza-peptonă Difco	3	g
— Lactoză	10	g
— Săruri biliare Difco nr. 3	1,5	g
— NaCl	5	g
— Agar	13,5	g
— Roşu neutru	0,03	g
— Cristal violet	0,001	g
— Apă	1 000	ml

pH — 7,1, sterilizare 15 minute la 120°C.

Coloniile lactozo-negative sînt transparente şi incolore, coloniile bacteriilor lactozo-pozitive sînt roşii-violacee.

Mediul S-S (Salmonella-Shigella). Compoziţie:

— extract de carne	5 g
— lactoză	10 g
— peptonă	5 g

— săruri biliare (săruri nr. 3 Difco) . . . . . 8,5 g
— hiposulfit de sodiu . . . . . 8,5 g
— citrat de fier . . . . . 1 g
— geloză . . . . . 17,5 g
— citrat de sodiu . . . . . 8,5 g
— verde briliant . . . . . 0,00033 g
— roşu neutru . . . . . 0,025 g
— apă distilată . . . . . 1 000 ml

Se ajustează pH=7; se sterilizează la 110°C. Se repartizează în plăci Petri. Pe acest mediu coloniile de *E. coli* se colorează în roşu, iar cele de *Salmonella* sau *Shigella* sînt transparente.

MEDII PENTRU IZOLAREA SALMONELELOR

Medii de îmbogăţire

Mediul Müller Kauffmann. Soluţiile necesare:

— carbonat de calciu pulbere sterilizat prin căldură uscată (180°C).
— soluţie de tiosulfat de sodiu ($S_2O_3Na_2+5H_2O$)—50 g în 100 ml apă, sterilizată 30 minute la 120°C
— soluţie iodo-iodurată: — iod metalic . . . . . 20 g
— iodură potasiu . . . . . 25 g
— apă distilată . . . . . 100 ml
(se dizolvă iodura de potasiu în apă distilată şi apoi iodul metalic)
— bilă sterilă de bou
— soluţie verde briliant 1‰ în apă distilată

Prepararea mediului:
— bulion peptonat pH 7,4 . . . . . 90 ml
— carbonat de calciu . . . . . 5 g
— soluţie tiosulfat de sodiu . . . . . 10 ml
— soluţie iodo-iodurată . . . . . 2 ml

La 100 ml din acest amestec se adaugă:
— soluţie verde briliant 1‰ . . . . . 1 ml
— bilă . . . . . 5 ml

Deoarece carbonatul de calciu nu se dizolvă, ci se depune la fundul balonului, amestecul se agită în momentul

repartizării în tuburi şi se repartizează steril cîte 7 ml în tuburile sterile.

Mediul cu selenit acid de sodiu.

Soluţia I:	— selenit acid de sodiu ($NaHSeO_3$) . .	2 g
	— apă distilată	100 ml
Soluţia II:	— lactoză	2 g
	— peptonă	2,5 g
	— fosfat disodic (Na_2HPO_4)	2,5 g
	— fosfat monosodic (NaH_2PO_4) . . .	2,5 g
	— apă distilată	400 ml

Soluţiile se sterilizează separat, 30 minute la 100°C (soluţia I rămîne limpede, soluţia a II-a prezintă un precipitat care se lasă să se depună 24 ore la temperatura camerei şi se decantează supernatantul clar).

Se amestecă soluţia I cu soluţia a II-a, se controlează pH-ul care trebuie să fie 7.

Medii selective

Mediul Wilson Blair. Compoziţie:

— geloză	20	g
— peptonă	10	g
— extract de carne	5	g
— sulfit de bismut	8	g
— glucoză	5	g
— fosfat disodic	4	g
— sulfat feros	0,3	g
— verde briliant	0,025	g
— apă	1 000	ml

pH — 7,7.

Mediul se toarnă în cutii Petri, ce se pot păstra timp de 3—4 zile la frigider; nu se recomandă topirea mediului de mai multe ori pentru că astfel scade acţiunea sa selectivă. Culoarea mediului la preparare este verde pal, opalescent. Pe acest mediu coloniile de *Salmonella* au culoare verzuie sau neagră cu luciu metalic, bacteriile coliforme sînt negre sau brune şi cresc greu.

Mediul Leifson

Soluţia 1:
— citrat de sodiu . . . . . 17 g
— hiposulfit de sodiu . . . . . 17 g
— citrat de fier (în lamele) . . . . . 2 g
— apă distilată . . . . . 100 ml
Se fierbe 3 minute.

Soluţia 2:
— dezoxicolat de sodiu . . . . . 10 g
— apă distilată 100ml
Dizolvare la 60°C.

Soluţia 3:
— lactoză . . . . . 20 g
— apă distilată . . . . . 100 ml
Se filtrează.

Soluţia 4:
— roşu neutru . . . . . 1 g
— apă distilată . . . . . 100 ml

Agar de bază:
— bulion carne . . . . . 350 ml
— peptonă . . . . . 10 g
— agar . . . . . 20 g
— apă distilată . . . . . 650 ml

Se ajustează pH — 7,3, se fierbe, se filtrează, se sterilizează 30 minute la 120°C.

Prepararea mediului:

— agar de bază . . . . . 1 000 ml
— soluţia 1 . . . . . 50 ml
— soluţia 3 . . . . . 50 ml
— soluţia 4 . . . . . 3 ml

Se fierbe 15 minute, apoi se adaugă 50 ml din soluţia 2. Sterilizare 15 minute în autoclavul deschis (100°), se toarnă în plăci. Mediul are culoare roz. Pe acest mediu coloniile de *Salmonella* şi *Shigella* sînt transparente, de *E. coli* au culoarea roşie, iar cele de Proteus sînt mate, uneori cu centrul închis (H_2S pozitiv).

Mediul Istrati Meitert

— Geloză 3% pH 7,8 . . . . . 100 ml
— Lactoză . . . . . 1,5 g
— Bilă uscată de bou . . . . . 0,8 g
— Citrat sodiu . . . . . 0,8 g
— Hiposulfit de sodiu . . . . . 0,8 g
— Citrat de fier în lamele . . . . . 0,2 g

Se topește geloza, se adaugă ingredientele în ordinea indicată. După dizolvare se adaugă 1 ml soluție de albastru bromtimol (vezi pag. 279). Se ajustează pH la 7,3—7,4 (culoare verde închis) folosind o soluție de hidroxid de sodiu 5—10%. Se fierbe 15 minute la baia de apă. Mediul are culoare verde închis, se poate păstra la frigider 2—3 zile. Coloniile aparținînd genului Shighella apar verzi, verzi albăstrui, relativ transparente, cele de *E. coli* sînt galbene opace, iar Proteus formează colonii izolate cu centrul mai opac care devine negru.

MEDII DE DIAGNOSTIC DIFERENȚIAL INTRE GERMENII DIN GENURILE ESCHERICHIA ȘI SALMONELLA

Geloză lactozată cu albastru bromtimol. La geloza 2% se adaugă lactoză 15‰ și 0,4% din soluția apoasă albastru bromtimol 20—25‰ (pH 6,9—7,1).

Mediul Endo:

— peptonă	10 g
— lactoză	10 g
— K_2HPO_4	3,5 g
— fibre de agar	15 g
— Na_2SO_3	2,5 g
— fucsină bazică	0,4 g
— apă	1 000 ml

Mediul este de culoare galbenă. În urma dezvoltării coloniilor de *E. coli*, culoarea mediului virează în roșu, iar în cazul coloniilor de *Salmonella* își menține culoarea.

Mediul Drigalski:

— bulion de carne	1 000 ml
— fibre agar	30 g
— peptonă Merck	10 g
— NaCl	5 g
— lactoză	15 g
— turnesol 10%	60 ml

Mediul are culoarea violetă-deschisă. Coloniile de *Salmonella* produc virarea culorii în albastru, iar cele de *E. coli* în roșu.

Mediul Gassner:

— agar nutritiv	2 000 ml
— soluție metacromgelb 2%	125 ml
— soluție wasserblau 1%	175 ml
— lactoză	10 g

Se prepară soluția de metacromgelb, care se filtrează și se fierbe 2 minute, iar separat se prepară soluția de wasserblau, care se filtrează, apoi se adaugă lactoza și se fierbe 10 minute. La agarul topit se adaugă mai întîi soluția de metacromgelb și apoi soluția de wasserblau. Mediul are o culoare verde-albăstruie. În urma dezvoltării germenilor pe suprafața acestui mediu, culoarea virează în galben în dreptul coloniilor de *Salmonella* și în albastru în dreptul coloniilor de *E. coli*.

MEDIUL SELECTIV PENTRU IZOLAREA SPECIEI VIBRIO FETUS

— bulion de carne	1 000 ml
— fibre agar	25 g
— peptonă Bacto	10 g
— clorură de sodiu	5 g
— verde briliant 1/100	2,5 ml

Se ajustează la pH 7,4—7,6. Sîngele se adaugă în momentul turnării în plăci.

Mediul însămînțat se incubează la 37°C în atmosferă normală sau în atmosferă de CO_2 15—20%. Durata incubației este de regulă 6—7 zile, excepțional 15—30 zile.

MEDII PENTRU CULTIVAREA LEPTOSPIRELOR

Mediul Korthof. Este un mediu sintetic, avînd următoarea compoziţie:

— peptonă Witte	400 mg
— clorură de sodiu	700 mg
— carbonat disodic	10 mg
— clorură de potasiu	20 mg
— clorură de calciu	20 mg
— fosfat monopotasic	90 mg
— fosfat disodic	480 mg
— apă distilată	500 ml

Mediul se sterilizează la temperatura de 100°C, timp de 30 minute. Se lasă să se răcească şi se filtrează prin hîrtie de filtru. Se repartizează în baloane şi se sterilizează din nou la 100°C timp de 30 minute. La mediul astfel pregătit se adaugă ser de iepure steril în proporţie de 5—10%. Serul de iepure trebuie să fie în prealabil inactivat timp de 30 minute la temperatura de 56°C. Leptospirele sînt aerobe, temperatura optimă de dezvoltare este de 28—30°C. Cultura atinge densitatea maximă la 5—7 zile.

Mediul Uhlenhuth. Se prepară astfel: se fierbe apa de fîntînă pînă ce se reduce volumul la jumătate, se filtrează şi se ajustează la pH 7,2—7,4, apoi se repartizează în eprubete mici de reacţie (Wassermann) sau în baloane, după necesităţi, se sterilizează 20 minute la 120°C, se adaugă apoi ser proaspăt de iepure în proporţie de 3—10% şi se inactivează 30 minute la 56°C.

MEDII PENTRU CULTIVAREA MICOPLASMELOR

Bulion PPLO. Mediul de bază:

— infuzie de cord de bou — 1 parte cord de bou
— 1 parte apă

Se lasă peste noapte la +4°C pentru macerat și apoi se fierbe o oră. Filtrarea prin hîrtie de filtru.

Se adaugă:
— Bactopeptonă . . . . . 1 %
— clorură de sodiu . . . . . 0,5 %
— hidrolizat de lactalbumină . . . . 0,3 %
— fosfat disodic $+2H_2O$ . . . . . 0,3 %
— acetat de taliu . . . . . 0,05 %
— extract de drojdie . . . . . 1 %

pH=7,8; sterilizare prin autoclavare (mai indicată filtrarea prin Seitz).

Se adaugă steril:
— ser de cal (neinactivat) . . . 10%
— ser de porc (inactivat) . . . 10%
— extract proaspăt drojdie . . . 5%
— glucoză 0,1%
— roșu fenol 0,002%
— penicilină . . . . . 1 000 U.I./ml

Agar PPLO. La mediul de bază se adaugă agar 1,2—1,4%. Înainte de a se turna în plăci, mediul se topește, se răcește la 50°C și se adaugă:

— ser de cal (neinactivat) 10%
— ser de porc (inactivat) 10%
— extract proaspăt de drojdie . . 5%
— penicilină (în caz de necesitate) . 1 000 U.I./ml

MEDII PENTRU CULTIVAREA BACTERIILOR ANAEROBE

Bulionul cu ficat Tarozzi. Se fierbe ficatul (de cal, bou, cobai, iepure), se taie în fragmente de formă paralelipipedică 3—4 cm înălțime și 1—2 cm lățime. Se introduc în tuburi cu 8—10 ml bulion simplu sau bulion glucozat 1% (se sterilizează la 110°C, timp de 20 minute).

Bulion VF. Mediu VF (de la inițialele cuvintelor: *viande*=carne, *foie*=ficat).

Preparare:
— ficat de bou . . . . . 250 g
— carne de bou . . . . . 250 g
— apă de robinet . . . . . 1 000 ml

— Ficatul și carnea se toacă mărunt și se fierb 20 minute;
— filtrare tifon;
— fragmentele de carne și ficat rămase în tifon se spală de 4—5 ori cu apă distilată, se usucă și se repartizează în tuburi în cantitate de aproximativ 1—3 g;
— lichidul obținut după filtrare se completează la volumul inițial, adăugîndu-se apă de robinet;
— se adaugă peptonă — 5 g, clorură de sodiu — 5 g;
— se încălzește pentru dizolvarea ingredientelor, se ajustează pH-ul la 8, se autoclavează 20 minute la 120°C, se adaugă glucoză 2% și se filtrează prin hîrtie de filtru;
— mediul obținut se repartizează aproximativ cîte 6 ml în tuburile în care s-au pus în prealabil cîte 3 g carne cu ficat;
— se poate pune la suprafață un strat de oleu de parafină cu grosimea aproximativ de 1 cm;
— se sterilizează timp de 15 minute la 115°C sau prin tindalizare la 100° (autoclavul cu capacul neînșurubat) timp de 30 minute, 3 zile consecutiv.

Înainte de folosire, mediul se regenerează prin fierbere.

Bulion VL. Mediul VL (de la inițialele cuvintelor: *viande*=carne, *levure*=levură — drojdie).

Mediul de bază se prepară din:

— peptonă triptică	10 g
— NaCl	5 g
— extract carne bou	2 g
— extract de drojdie	5 g
— clorhidrat cisteină	0,3 g
— apă	1 000 ml

Se ajustează pH la 7,2—7,4. Sterilizare prin autoclavare.

Rezultate mai bune se obțin în cultivarea unor bacterii anaerobe (de ex. *Sphaerophorus necrophorus)* dacă la mediul de bază se adaugă glucoză 2 g‰ și agar pudră 0,6 g‰.

Geloza VF pentru izolarea bacteriilor anaerobe:

— bulion VF	980 g
— geloză	20 g

Geloza Veillon:

— bulion simplu	1 000 ml
— agar	8—10 g
— glucoză	5—10 g
— azotat de potasiu	1— 2 g

Se dizolvă glucoza şi azotatul de potasiu în bulion, se adaugă agarul, se încălzeşte la autoclav, se filtrează prin vată, se repartizează în tuburi Weinberg (diametrul 0,8—1 cm şi înălţimea 20—25 cm), astfel ca mediul să ocupe mai mult de jumătate din înălţimea tubului. Se sterilizează la 115°C timp de 15 minute. Pentru solidificarea mediului, tubul se menţine în poziţie verticală.

IZOLAREA BACTERIILOR ÎN CULTURI

TEHNICA ÎNSĂMÎNŢĂRII BACTERIILOR

Bacteriile se cultivă pe medii de cultură în scopuri diferite, şi anume: pentru examinarea caracterelor în vederea identificării, pentru a le conserva, pentru a prepara din ele vaccinuri sau pentru a le inocula la animale în vederea preparării serurilor imune sau a determinării patogenităţii.

Culturile microbiene se obţin prin însămînţare sau transplantare. Însămînţarea este operaţia prin care se introduc bacteriile dintr-un material de examinat în medii de cultură, iar transplantarea este operaţia de trecere a bacteriilor din culturi vechi pe medii proaspete. Pentru a se folosi culturile în scopurile amintite, acestea trebuie să îndeplinească o condiţie esenţială — să fie pure, adică să conţină bacterii aparţinînd unei singure specii microbiene. Aceasta se realizează executîndu-se însămînţarea astfel ca să se evite pătrunderea unor germeni nedoriţi din aer sau de pe instrumentul cu care se manipulează materialul.

Însămînţarea se poate executa cu pipeta Pasteur sau cu acul drept. Totdeauna se însămînţează perechi de medii, şi anume: un mediu lichid şi un mediu solid. Suprafaţa organului se cauterizează în prealabil cu o spatulă de flambare. Însămînţarea se execută în faţa flăcării unui bec de gaz care asigură sterilitatea operaţiunii.

— **Însămînţarea cu pipeta Pasteur.** Se aşază tuburile cu mediile ce urmează a fi însămînţate într-un stativ sau într-o cutie pe masă la îndemîna mîinii stîngi a operatorului; tava cu cadavrul sau organele se aşază în faţa operatorului lîngă becul de gaz, iar la îndemîna mîinii drepte trebuie să se găsească un borcan cu anse, pipete Pasteur şi spatule de flambare şi un al doilea borcan cu o soluţie dezinfectantă pentru pipete.

Se cauterizează suprafaţa organului cu spatula flambată, aplicată în zona din care se face însămînţarea.

Se ia în mîna dreaptă pipeta Pasteur, se flambează extremitatea prin care se aspiră, apoi i se rupe vîrful, se sterilizează exteriorul pipetei, trecîndu-l de trei ori prin flacără şi se suflă în pipetă pentru a o răci. În momentul cînd aerul suflat din pipetă este rece, aceasta se introduce în organ, în zona în prealabil cauterizată şi se aspiră mişcînd uşor pipeta în interiorul organului. În cazul organelor mici, trebuie o grijă deosebită, pentru a nu perfora organul în partea opusă.

Se scoate pipeta din organ şi se ia în mîna stîngă tubul cu mediul lichid, ţinîndu-l de fund cu trei degete, iar cu degetul mic al mîinii drepte, în care se găseşte pipeta Pasteur cu material recoltat, se scoate dopul, se flambează gura tubului şi se introduce vîrful pipetei în mediu.

Se aspiră din mediu, fără a acorda importanţă cantităţii, după care se lasă cîteva picături înapoi, oprind res-

tul în pipetă. Se scoate pipeta din mediul lichid, se flambează gura tubului şi se astupă.

Se pune tubul la loc în stativ, se ia tubul cu mediul solid, care se deschide cu aceleaşi măsuri de precauţie la flacără, se introduce pipeta cu materialul diluat cu mediul lichid, oprindu-se vîrful în dreptul extremităţii superioare a agarului înclinat şi se însămînţează lăsînd materialul să se prelingă pe suprafaţa mediului de sus în jos, după care se scoate pipeta din tub şi se astupă după flambare.

Pipeta cu care s-a executat însămînţarea se pune în borcanul cu dezinfectant.

După mai multe exerciţii, însămînţarea se poate executa ţinînd ambele tuburi în mîna stîngă, pentru a micşora pe cît posibil timpul în care materialul de însămînţat este vehiculat prin aer.

Însămînţarea cu acul drept. Se cauterizează suprafaţa organului şi se sterilizează acul prin încălzire la roşu, iar tija acului prin flambare de trei ori. Se aşteaptă cîteva secunde, timp necesar răcirii acului. Apoi se înţeapă organul în zona în prealabil cauterizată, mişcînd acul în interiorul organului. Se scoate acul din organ şi se face însămînţarea în mediul lichid prin clătirea acului în mediu.

Fără a flamba acul, acesta se introduce în tubul cu mediul solid. Însămînţarea se poate face în două feluri: se plimbă vîrful acului în zigzag pe suprafaţa mediului, porninд din lichidul de condensare spre partea superioară a mediului, sau se clăteşte vîrful acului în lichidul de condensare şi apoi se spală întreaga suprafaţă a mediului cu acest lichid prin înclinarea tubului.

La închiderea şi deschiderea tuburilor, se iau aceleaşi măsuri de asigurare a sterilităţii, flambînd gura lor imediat după deschidere şi înainte de închidere. La sfîrşitul operaţiunii, acul se sterilizează prin încălzire la roşu.

Însămînţarea din măduva oaselor lungi. Se taie osul cu foarfeca, costotomul sau fierăstrăul, în funcţie de grosi-

mea lui, se introduce în flacără şi se sterilizează suprafaţa de secţiune a osului.

Prin suprafaţa de secţiune arsă se introduce în canalul medular pipeta Pasteur sau acul drept sterilizate prin tehnicile descrise mai sus şi se aspiră o cantitate de măduvă. Apoi se execută însămînţarea în mediu lichid şi solid.

Însămînţarea din materiale patologice lichide (sînge, exsudate, secreţii şi excreţii. Tehnica şi succesiunea timpilor nu diferă principial de tehnicile descrise mai sus. Diferă numai tehnica de recoltare a materialului cu care se face însămînţarea.

Recoltarea sîngelui se face prin puncţii cu seringi şi ace sterile. La animalele de laborator (iepuri, cobai), sîngele se recoltează prin puncţia cordului, la animalele mari — prin puncţii venoase. În asemenea situaţii, sîngele se poate recolta direct în baloane cu medii de cultură la care se adaptează un tub de cauciuc şi un ac steril.

Recoltarea exsudatelor (lichid pleural, peritoneal, puroi etc.) se face prin puncţia sterilă a cavităţilor respective, cu acul şi în cazurile unde este posibil cu pipeta Pasteur.

Recoltarea secreţiilor şi excreţiilor se face în mod diferit în funcţie de produs. Astfel, laptele se recoltează cu o sondă mamară sterilă. Urina este de preferat să fie recoltată direct din vezică cu un cateter steril, iar materiile fecale direct din ampula rectală.

Însămînţarea de pe suprafaţa mucoaselor. Se execută cu ajutorul unor tampoane sterile cu care se tamponează mucoasa respectivă, după care fie că se poate face însămînţarea direct cu tamponul pe medii, fie că tamponul se spală într-un lichid diluant steril şi apoi se execută însămînţarea din acesta.

Transplantarea se face în mod diferit, în funcţie de mediul în care se găseşte cultura veche.

Transplantarea din culturi-medii lichide. Recoltarea materialului se poate face din culturi în medii lichide, fie cu pipeta Pasteur, fie cu ansa de însămînţare. În cazul transplantării cu pipeta Pasteur, se recoltează o cantitate arbitrară din cultura veche, din care se însămînţează cîteva picături în mediul lichid şi cîteva picături pe suprafaţa mediului solid.

În cazul transplantării cu ansa, se introduce ansa în cultura veche, după care se face însămînţarea mediului lichid prin spălarea ansei şi în continuare, evitînd flambarea ansei, se face însămînţarea mediului solid.

Transplantarea din culturi-medii solide. În acest caz, transplantarea se face cu ansa. Se raclează o cantitate arbitrară din cultura veche ca pentru executarea unui frotiu. În continuare tehnica nu diferă de aceea a transplantării cu ansa din culturi în medii lichide.

În afara tehnicilor descrise mai sus care se referă la însămînţări sau transplantări pe medii uzuale se practică frecvent şi alte tehnici care sînt determinate de natura mediului.

Însămînţarea prin înţepare. Se execută în agar moale sau în gelatină solidificată vertical. Se face cu acul drept, care după ce a fost încărcat cu materialul de însămînţat, se introduce în profunzimea mediului pe linia mediană.

Însămînţarea în plăci Petri. Se execută pe suprafaţa mediilor solide turnate în plăci Petri. În acest scop, se topeşte agarul drept şi se toarnă după răcire la 45°C şi flambarea gurei eprubetei, în plăci Petri sterile, astfel ca să se obţină un strat de 4—5 mm grosime. Însămînţarea se face după solidificarea mediului procedîndu-se astfel:

Se pune o picătură din materialul de însămînţat pe suprafaţa mediului şi se împrăştie materialul cu ajutorul unei anse executînd fie linii în zigzag, fie linii perpendiculare una pe alta. Această operaţie se poate executa şi cu o spatulă Drigalsky (o pipetă Pasteur îndoită la flacără).

Placa însămînţată se introduce în termostat cu capacul în jos.

Alegerea materialului din care se execută însămînţarea diferă în funcţie de germenul infectant şi de caracterul anatomo-clinic al infecţiei. Cîteva indicaţii orientative de care trebuie să se ţină seama la executarea însămînţărilor sînt redate în tabelul 30.

În timpul executării însămînţărilor trebuie să se ţină seama de următoarele reguli:

— Însămînţările să se execute în boxe sterile sau la adăpostul unor hote special amenajate în acest scop.

— În timpul însămînţării este interzis să se vorbească şi trebuie evitată orice mişcare de prisos în jurul operatorului.

TABELUL 30

Materialele din care se recomandă executarea însămînţărilor în funcţie de caracterul infecţiei

Nr. crt.	Caracterul infecţiei	Animalul viu sau cadavru	Materialul din care se execută însămînţarea
1	Infecţii septicemice	Animal în viaţă	Din sînge în ultima fază a bolii
		Cadavru	Din cord şi măduva oaselor lungi
2	Infecţii piemice	Cadavru	Din organele în care se găsesc leziunile
3	Infecţii localizate	Animal viu sau cadavru	Din organul unde este localizată leziunea

— Însămînțările să se execute cît mai repede, urmărind un contact minim al materialului de însămînțat cu aerul nesteril.

— Trebuie evitată atingerea instrumentului cu care se execută însămînțarea de orice obiect nesteril (mîna operatorului, halat, gura tubului, masa de lucru etc.).

— În timpul în care recipientele cu mediile sterile ori însămînțate sau cu culturile pure sînt deschise se urmărește ținerea lor într-o poziție oblică, cît mai aproape de orizontalitate și cu gura în imediata apropiere a flăcării.

După executarea însămînțării pe tuburile sau recipientele respective se notează cu creionul dermatograf sau cerneală de scris pe sticlă numărul sau simbolul tulpinii și data însămînțării.

Mediile însămînțate se pun la incubat la termostat. Temperatura la care se reglează termostatul depinde de germenii a căror cultivare o urmărim. Majoritatea bacteriilor patogene sînt mezofile, temperatura lor optimă de dezvoltare fiind în jur de 37°C.

Durata incubației este, de asemenea, în funcție de specia microbiană. Majoritatea speciilor bacteriene dau culturi bine dezvoltate în timp de 24 de ore.

TEHNICI DE SEPARARE ÎN CULTURI PURE A BACTERIILOR DIN MATERIALE CARE CONȚIN O FLORĂ MIXTĂ

Materialul patologic din care se fac însămînțări, în vederea stabilirii diagnosticului bacteriologic, deseori conține o floră variată. În acest caz, prin însămînțarea obișnuită se obține o cultură mixtă.

Pentru a izola o specie bacteriană în cultură pură, se folosesc următoarele metode mecanice, fizice, chimice, biologice.

Metode mecanice de izolare. Constau în împrăştierea materialului cu flora bacteriană mixtă pe suprafeţe cît mai mari de mediu solid, astfel ca să se obţină colonii izolate. Dispersiunea se poate face pe suprafaţa agarului înclinat sau în plăci Petri.

Se procedează astfel: pentru tuburile cu agar înclinat se recoltează materialul cu acul şi se însămînţează mai multe tuburi plimbînd acul pe suprafaţa mai multor medii solide pînă la epuizarea materialului.

În plăci Petri: pe suprafaţa agarului se pune o picătură din material şi se împrăştie cu ajutorul acului executînd linii paralele perpendiculare unele pe altele pornind de la picătura depusă. Împrăştierea se poate face şi cu ajutorul spatulei Drigalsky (pipeta Pasteur îndoită la flacără).

Izolarea se poate executa şi pe medii lichide prin metoda diluţiilor preconizată de Pasteur. Rezultatele însă nu sînt satisfăcătoare, deoarece cu greu se pot obţine în ultimele diluţii bacterii aparţinînd unei singure specii.

Metodele mecanice nu dau totdeauna rezultate chiar dacă dispersiunea se face pe medii solide, pentru că în materialul de examinat pot exista specii mobile ca *Proteus vulgaris*, care acoperă în scurt timp suprafaţa mediului inhibînd astfel dezvoltarea altor specii microbiene.

Metode fizice de izolare. Se folosesc pentru izolarea bacteriilor sporulate. În acest scop materialul se însămînţează într-un mediu favorabil dezvoltării speciei sporulate şi se încălzeşte timp de 10 minute la 75—80°C, temperatură care distruge formele vegetative, fără să fie nocivă pentru spori. Aceeaşi metodă poate fi folosită şi pentru punerea în evidenţă a prezenţei sporilor în materiale în care aceştia se găsesc în număr mic şi nu sînt evidenţiabili în frotiuri.

Metode chimice de izolare. Se bazează pe adăugarea la mediu a unor substanţe bactericide sau bacteriostatice pen-

tru unele specii, dar inactive pentru specia care trebuie izolată. Pe acest principiu se bazează folosirea mediilor selective.

În afara mediilor selective se poate folosi, în scopul izolării în cultură pură a unor specii, tratarea materialului microbian cu substanţe chimice, care au acţiune bactericidă asupra unor specii neavînd acţiune nocivă asupra altora. Astfel este cazul bacilului tuberculozei.

Metode biologice de izolare. Constau în inocularea materialului cu flora variată, la animalele sensibile faţă de specia pe care urmărim s-o izolăm. În acest caz, animalul îndeplineşte rolul unui filtru biologic, prin faptul că distruge la poarta de intrare germenii saprofiţi, dar nu poate distruge germenii patogeni ce persistă şi se multiplică în organismul animal, provocînd, în majoritatea cazurilor, moartea acestuia. De la cadavru se fac însămînţări din diferite organe şi se obţin, de regulă, culturi pure.

PARTICULARITĂŢI PRIVIND IZOLAREA BACTERIILOR ANAEROBE

Bacteriile prezintă variaţii considerabile în ceea ce priveşte necesitatea de oxigen, deosebindu-se din acest punct de vedere bacterii aerobe, anaerobe şi facultativ anaerobe. Însămînţate într-un mediu solid sau semisolid în coloană, se vor dezvolta la nivele diferite (cele aerobe mai la suprafaţă, cele anaerobe în profunzime, iar cele facultativ anaerobe în toată coloana mediului).

Pentru cultivarea bacteriilor anaerobe este necesar să se împiedice pătrunderea aerului în mediul în care se dezvoltă, deoarece chiar dacă mediul conţine toate elementele nutritive, nu va permite dezvoltarea acestora în cazul prezenţei oxigenului.

Mediile lichide sau solide pentru bacteriile anaerobe, imediat după sterilizare prin fierbere sau autoclavare, nu conţin aer şi pot fi însămînţate cu germeni anaerobi. Pentru a împiedica pătrunderea oxigenului în mediile lichide însămînţate, tubul se închide ermetic sau suprafaţa mediului se acoperă cu o substanţă impermeabilă pentru aer, cum este oleul de parafină. Oxigenul dizolvat în mediu lichid se poate îndepărta prin adăugarea unor substanţe chimice sau produse biologice cu proprietăţi reductoare. Acelaşi rezultat se obţine şi prin introducerea porţiunilor de ţesuturi vegetale sau animale, ca felii de morcov, cartof, fragmente de muşchi, rinichi, creier, ficat, albuş de ou fiert care au o acţiune dezoxigenantă, datorită în mare parte conţinutului lor în cisteină.

Mediile uzuale anaerobe lichide la suprafaţa cărora nu s-a adăugat un strat izolator de oleu de parafină trebuie să fie regenerate înainte de însămînţare. Regenerarea constă în fierberea mediilor timp de 10 minute într-o baie de apă şi are ca scop eliminarea oxigenului care s-a acumulat între timp în mediu.

Operaţia de însămînţare se execută la fel ca pentru bacteriile aerobe, cu următoarele deosebiri:

Geloza Veillon se însămînţează în stare lichefiată şi răcită la 45°C. După însămînţarea gelozei Veillon tubul se agită, în vederea răspîndirii uniforme a germenilor în masa mediului, avînd însă grijă să nu se formeze bule de aer. După aceea mediul se solidifică brusc, prin introducerea tubului într-un vas cu apă rece. Mediile însămînţate şi notate se incubează apoi tot la temperatura de 37°C (temperatura optimă pentru majoritatea speciilor patogene).

În medii solide pătrunderea oxigenului este împiedicată prin repartizarea mediului în tuburi înguste şi înalte, astfel ca să se obţină o coloană cît mai înaltă. Anaerobii se dezvoltă în straturile profunde ale mediului, dar nu la suprafaţa sa.

Pentru cultivarea anaerobilor se folosesc curent bulionul cu carne, mediul VF și geloza Veillon.

Anaerobioza se poate obține și prin alte procedee, îndepărtîndu-se aerul dintr-un spațiu ermetic închis. Aceasta se poate realiza prin diferite metode și anume metode fizice, chimice și biologice.

Metode fizice. Constau în extragerea aerului cu o pompă de vid dintr-un recipient ermetic închis denumit anaerostat. Anaerostatul este un recipient metalic de formă cilindrică, care se poate închide ermetic. E prevăzut cu o tubulură laterală ce poate fi închisă sau deschisă cu ajutorul unui robinet. Pe tubulura laterală se găsește un vacuummetru. Prin tubulura la care se adaptează tubul unei pompe de vid se scoate aerul din aparat, creîndu-se astfel condiții de anaerobioză necesare cultivării bacteriilor anaerobe. Presiunea din interiorul recipientului trebuie redusă pînă la 0,02 mm mercur. Prin acest procedeu, se reușește să se cultive chiar bacteriile strict anaerobe pe suprafața agarului în plăci Petri. Aerul atmosferic extras cu pompa de vid poate fi înlocuit cu hidrogen sau azot.

Metode chimice. Se bazează pe faptul că unele combinații chimice au loc cu consum de oxigen. Se pot folosi două tehnici:

1. Mediile însămînțate se introduc într-un exicator în care se pun substanțe chimice ca acidul pirogalic și hidroxidul de potasiu (1 ml soluție de pirogalol 20% și 1 ml hidroxid de potasiu soluție saturată). Reacția dintre cele două substanțe asigură absorbția unui volum de 44 cm^3 oxigen care se găsesc în 220 cm^3 aer.

2. Materialul se însămînțează pe suprafața unei plăci Petri. Pe capacul plăcii se fixează cu leucoplast sau o bandă adezivă un plic de hîrtie cu următorul amestec:

— pirogalol . . . . . 1 g
— carbonat potasiu . . . . . 1 g
— pămînt infuzorii . . . . . 5 g

Amestecul se repartizează în plicuri cîte 2 g.

După fixarea plicului, placa se închide fixînd capacul de fundul plăcii printr-o bandă adezivă creindu-se astfel un spaţiu închis. Plăcile se pot incuba cîteva zile la 37°C.

Se poate proceda şi altfel: se fixează plicul pe capacul plăcii (în exterior), apoi fundul cutiei care conţine mediul însămînţat se răstoarnă peste capac şi cu o bandă adezivă se fixează cele două părţi între ele. Incubarea se face cu capacul deschis în jos.

Metode biologice. Au fost imaginate de Fortner şi constau în cultivarea într-un spaţiu închis a unei specii bacteriene aerobe, împreună cu una anaerobă.

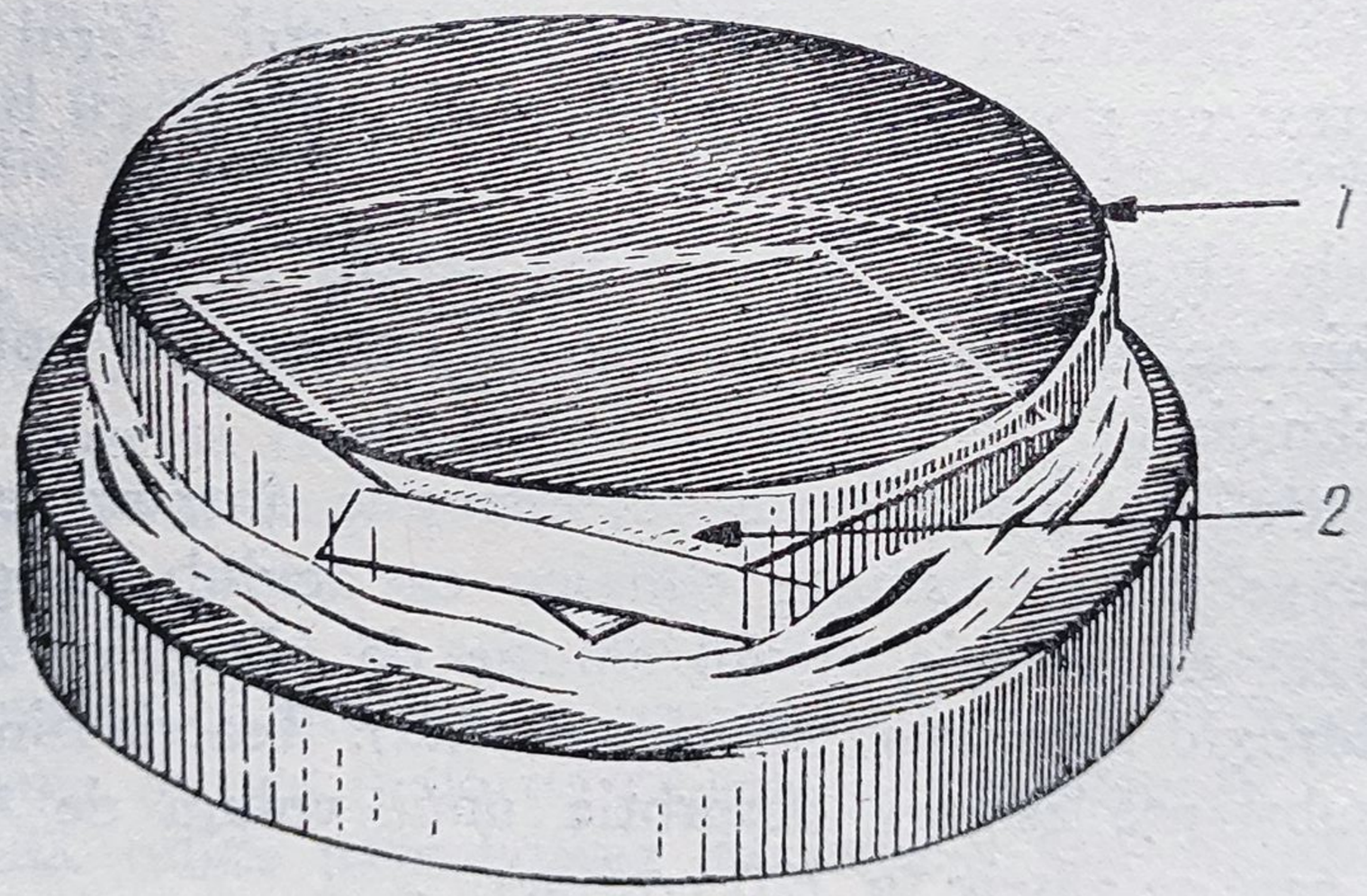


Fig. 10 — Cultivarea bacteriilor anaerobe în plăci Petri:

1 — stratul de agar însămînţat în suprafaţă; *2* — plicul cu amestec de pirogalol, carbonat de potasiu şi pămînt de infuzori

Separarea în culturi pure a bacteriilor anaerobe din materiale conţinînd o floră mixtă

Dacă materialul este putrefiat şi se urmăreşte izolarea unei specii anaerobe sporulate, este necesar să se încălzească mediile însămînţate, timp de 15—30 minute, la 70°C, pentru a distruge flora de putrefacţie nesporulată.

În cazul cînd se obţin în medii lichide, culturi mixte de germeni sporulaţi, izolarea se poate face prin metoda diluţiilor în geloza Veillon. Din cultura mixtă în mediu lichid se însămînţează o picătură cu ansa într-un tub cu geloză Veillon. Din acesta se trece cu pipeta, atît cît se ia prin capilaritate, în alt tub cu geloză Veillon repetîndu-se în acelaşi fel transplantarea în mai multe tuburi. Astfel, în ultimele se obţin colonii izolate şi puţine. Din coloniile cu aspect caracteristic se fac transplantări pe medii pentru anaerobi aspirînd colonia cu o pipetă la care s-a ataşat un tub de cauciuc pentru a se manipula mai uşor. Dacă colonia se găseşte în profunzimea mediului, tubul se taie în dreptul coloniei, fragmentul de mediu în care se găsesc coloniile se răstoarnă într-o cutie Petri sterilă, după care se face transplantarea din colonia cea mai caracteristică. O altă metodă este dispersiunea pe suprafaţa mediilor solide, identică cu cea folosită pentru bacteriile aerobe, exceptînd condiţiile de incubare.

Metode de cultivare a germenilor în atmosferă de bioxid de carbon. Unele bacterii se incubează în atmosferă de CO_2. La aceste specii bacteriene nevoia de CO_2 este mai accentuată în momentul izolării. Concentraţia de CO_2 trebuie să fie de aproximativ 10—20%.

Metodele de creare a atmosferei cu CO_2: 1) tuburile cu mediile însămînţate se introduc într-un anaerostat. Alături se aşază o cantitate de gheaţă carbonică (o linguriţă pentru 5 l aer), apoi se înşurubează imediat capacul anaerostatului; 2) prin tubulura laterală a anaerostatului se introduce cantitatea necesară de CO_2, fie direct dintr-o butelie,

fie o cantitate măsurată. Practic, pentru măsurarea volumului de CO_2, se poate folosi o cameră de minge de fotbal.

EXAMENUL CARACTERELOR CULTURALE

Bacteriile dezvoltîndu-se pe medii de cultură, dau aspecte diferite şi unul din criteriile de identificare îl constituie examenul caracterelor culturale. La examinarea caracterelor culturale, se vor lua în considerare diferite aspecte ce le prezintă culturile în medii lichide şi pe medii solide.

În medii lichide bacteriile se dezvoltă diferit, unele tulbură uniform mediul, altele formează membrană, altele depozit. În general, în cazul culturilor în medii lichide se examinează următoarele caractere: turbiditatea, depozitul, suprafaţa.

Turbiditatea poate fi accentuată sau discretă sau poate să lipsească, mediul fiind în acest caz limpede.

Depozitul poate fi absent sau prezent. În cazul cînd există, poate fi mic sau abundent, pulverulent, granular, floconos ,membranos sau vîscos, omogenizabil sau neomogenizabil la agitare.

La suprafaţă, se formează uneori un inel, peliculă sau membrană care poate fi subţire sau groasă, cu suprafaţa netedă, granulată, aspră sau încreţită.

Pe medii solide, bacteriile multiplicîndu-se pe suprafaţa mediului constituie aglomerări denumite colonii. Coloniile, fiind formate dintr-un număr imens de germeni, sînt vizibile cu ochiul liber sau cu lupa. Dimensiunile şi forma variază. În cazul culturilor de pe suprafaţa mediilor solide se examinează: forma coloniilor, dimensiunea, aspectul pe secţiune (profil), suprafaţa, marginile, culoarea, opacitatea, consistenţa, emulsionabilitatea, deosebindu-se diferite aspecte, astfel:

1 — forma poate fi circulară, neregulată, radiară, rizoidă;
2 — dimensiunile pot fi diferite, diametrul coloniilor variind de la 0,1 mm la 3—4 mm sau mai mult;
3 — aspectul pe secţiune poate fi: plat, reliefat, concav, ombilicat, convex cu suprafaţa papilară;
4 — suprafaţa poate fi: netedă, aspră, granulară, lucioasă sau mată;
5 — marginile sînt regulate sau neregulate;
6 — din punctul de vedere al opacităţii, coloniile pot fi transparente sau opace;
7 — consistenţa poate fi vîscoasă, friabilă;
8 — emulsionabilitatea poate fi uşoară sau dificilă, obţinîndu-se suspensii fie omogene, fie granulare, fie membranoase;
9 — culoarea, în cazul cînd coloniile sînt pigmentate se pot deosebi pigmenţi de diferite culori: albi, galbeni, verzi, roşii, portocalii etc.

Pentru identificarea speciilor bacteriene, se examinează aspectul cultural atît pe medii solide cît şi în cele lichide, deoarece unele bacterii aparţinînd diferitelor specii, deşi au aspecte culturale asemănătoare în medii lichide, pe medii solide formează colonii cu aspect caracteristic sau invers.

Bacteriile anaerobe în medii lichide, în general, nu au un aspect caracteristic, toate tulburînd uniform mediul. În mediul solid (geloza Veillon), formează însă două feluri de colonii. Bacteriile mobile produc colonii pufoase, de exemplu, *Cl. tetani*, *Cl. chauvoei*, iar cele imobile produc colonii lenticulare, de exemplu, *Cl. perfringens*.

METODE DE PUNERE ÎN EVIDENŢĂ A MOBILITĂŢII BACTERIILOR PE BAZA ASPECTULUI CULTURAL

Metoda însămînţării în lichidul de condensare. Se execută însămînţarea cu ansa într-un tub cu agar înclinat, în

lichidul de condensare de la fundul tubului, ferind atingerea mediului cu ansa în alte porţiuni. Se incubează mediul însămînţat timp de 24 de ore la 37°C. O bacterie imobilă nu se dezvoltă în acest caz decît la fundul tubului. Bacteriile mobile nu rămîn însă cantonate în zona însămînţată şi invadează mediul acoperindu-l uneori în întregime. Această metodă este aplicabilă numai în cazul bacteriilor foarte mobile ca cele din genul *Proteus* sau unele specii de *Bacillus*.

Metoda cultivării în medii semisolide. Dacă se însămînţează prin înţepare o bacterie imobilă în agar moale, ea se dezvoltă numai de-a lungul liniei parcurse de ansă, restul mediului rămînînd limpede. În aceleaşi condiţii de lucru, o bacterie mobilă invadează întreaga masă a mediului opacifiindu-l uniform.

Metoda tubului în U. Metoda tubului în U (după V a h l n e) sau metoda transmigraţiei: se confecţionează tuburi în formă de U din ţeavă fuzibilă, avînd lumenul cu diametrul de 5—6 mm. Lungimea unei ramuri trebuie să fie de aproximativ 8—10 cm. În aceste tuburi, se repartizează un mediu de cultură-agar nutritiv 0,2—0,4%. Mediul de cultură ajunge în ambele ramuri ale tubului la 1/2 din înălţimea acestora. Ambele extremităţi se astupă cu dopuri de vată, după care se sterilizează prin autoclavare. După solidificarea mediului într-una din ramurile tubului se însămînţează, în condiţii sterile, tulpina bacteriană de examinat. Tuburile însămînţate se incubează la termostat la 37°C, urmărindu-se din timp în timp.

Speciile bacteriene imobile se dezvoltă numai în ramura în care s-a făcut însămînţarea şi numai de-a lungul liniei de însămînţare, în timp ce speciile bacteriene mobile difuzează în toată masa mediului, producînd o turbiditate uniformă a acestuia, invadîndu-l pînă la suprafaţa mediului din ramura opusă.

Cu privire la oportunitatea aplicării diferitelor metode de punere în evidenţă a cililor se va alege o metodă sau alta în funcţie de scopul urmărit. Metodele de colorare nu au aplicaţii curente. Ele se folosesc mai mult în scopuri didactice, pentru demonstrarea morfologiei cililor. Metoda indirectă a examenului în picătură suspendată sau între lamă şi lamelă se practică cu rezultate bune, dar nu sînt totdeauna concludente în cazul bacteriilor slab mobile. Metoda însămînţării în lichidul de condensare nu este aplicabilă decît în cazul germenilor foarte mobili (de ex., *Proteus vulgaris*). Metoda tuburilor în U poate fi considerată cea mai bună, dă rezultate şi în cazul speciilor slab mobile şi este astăzi cel mai frecvent utilizată.

METODELE DE CONSERVARE A TULPINILOR BACTERIENE ÎN COLECŢII

După izolare şi identificare, unele tulpini bacteriene se introduc în colecţia laboratorului pentru a se continua studierea lor în vederea identificării sau pentru a se face diferite cercetări.

Conservarea tulpinilor bacteriene se poate face prin diferite metode.

a) *În culturi*, asigurîndu-se anumite condiţii, un mediu de cultură corespunzător, anumită temperatură, evitarea acţiunii factorilor nocivi ca lumina, uscăciunea şi transplantări periodice. După cum se vede în tabelul 31, mediul de cultură, temperatura şi intervalul maxim de transplantare variază în raport cu specia bacteriană.

Pentru a se evita uscarea mediilor, recipientele (tuburi, baloane) se închid cît mai etanş prin diferite sisteme:

— închidere la flacără;

— închiderea cu dopuri de plută, introduse peste dopul

TABELUL 31

Condițiile de conservare în culturi vii a unor specii bacteriene

Nr. crt.	Genul sau specia bacteriană	Mediul optim pentru conservare	Temperatura optimă	Intervalul optim de transplantare
1	Stafilococi, colibacili, salmonele, proteus	Agar moale	+4°C	90 zile
2	*Pasteurella multocida*	Bulion	+18°C	30 zile
3	*Actionobacillus mallei, Brucella*	Cartof glicerinat	+18°C	30 zile
4	*Actinobacillus lignieresii*	Bulion	+18°C	10 zile
5	Streptococi	Bulion cu ser	+4°C	30 zile
6	Bacilul rujetului și listeria	Bulion	+4°C	60 zile
7	*Sphaerophorus necrophorus*	Bulion cu carne și ser	+18°C	6 zile
8	Genul *Bacillus*	Agar înclinat	+18°C	cîțiva ani
9	Genul *Clostridium*	Geloză Veillon	+18°C	cîțiva ani
10	Genul *Leptospira*	Mediul Korthof	+18°C	14—20 zile
11	*M. tuberculosis*	Mediul Löwenstein sau cartof glicerinat	+18°C	90 zile
12	Genul *Corynebacterium* (*C. pyogenes, C. renale, C. equi, C. pseudotuberculosis*	Bulion sau bulion cu ser în funcție de specie	+18°C	30—60 zile

de vată după ce acesta a fost în prealabil ars puțin și împins în interiorul tubului;

— aplicarea unei benzi de leucoplast sau scotch peste dopul de vată după ce acesta a fost împins în interiorul tubului și parafinare;

— astupare cu o rondelă de sticlă, după înfundarea dopului de vată; acesta se fixează cu un strat gros de gelatină glicerinată, se lasă să se usuce și se acoperă cu un strat de lac;

— folosirea tuburilor prevăzute cu capace care se fixează prin înșurubare sau alte sisteme.

b) *Uscare* la temperaturi peste 0°C. Se poate folosi pentru conservarea speciilor sporulate. Se introduc în culturi fire de mătase, bucățele de burete steril și apoi se usucă prin evaporare lentă în recipiente închise, sterile.

c) *Congelarea* se realizează în congelatoare la temperaturi scăzute între —20°C și —90°C.

d) *Liofilizarea* este o operație de uscare a materialului prin înghețare în vid. Se realizează în aparat special — liofilizator. Materialul de conservat se introduce în fiole speciale în condiții de strictă sterilitate, se supune înghețului așezînd fiolele într-o baie de gheață carbonică și apoi fiolele se adaptează la o pompă de vid și se țin astfel pînă cînd pojghița de gheață de pe perete se desprinde.

Fiolele cu materialele liofilizate se păstrează în general la frigider.

Conservarea culturilor bacteriene omorîte. Pentru a se păstra timp mai îndelungat diferite aspecte culturale, culturile se inactivează în general cu formol procedîndu-se astfel:

— Pentru culturile în tuburi se moaie în formol partea inferioară a dopului de vată, se pune dopul la loc și se lasă tuburile la temperatura camerei sau la termostat 24—48 ore.

— Pentru culturi în plăci Petri se moaie o hîrtie de filtru în formol, se pune în capacul plăcii, se lasă 48 ore, apoi se scoate și se fixează capacul plăcii cu parafină.

DETERMINAREA NUMĂRULUI DE BACTERII DINTR-UN PRODUS

Determinarea numărului de bacterii dintr-un produs poate să prezinte interes sub două aspecte.

1. Numărul total de germeni, care poate fi determinat prin:

— examen microscopic în frotiuri colorate prin metoda Gram sau al membranelor filtrante după filtrarea lichidului examinat;

— metoda nefelometrică (cu scara Brown sau Mac Farland).

2. Numărul total de germeni vii, pentru aprecierea căruia se pot folosi mai multe metode printre care sînt mai frecvent folosite metoda culturilor în plăci și metoda diluțiilor.

Determinarea numărului total de germeni prin examen microscopic. Se numără bacteriile în frotiuri după ce se calculează în prealabil suprafața cîmpului microscopic în microni și numărul cîmpurilor microscopice într-un cm^2 (100 mm^2), ceea ce se numește factorul microscopului (MF).

Metoda nefelometrică. Pentru a stabili numărul de germeni dintr-o cultură sau suspensie microbiană, se compară turbiditatea acesteia cu turbiditatea unor diluții standard de germeni sau de pulberi inerte (clorură de bariu, sticlă pirex pisată).

O întrebuințare largă în numărătoarea germenilor prin metoda nefelometrică o au scările nefelometrice Mac Farland și Brown.

Metoda culturilor în plăci. Din material de examinat se fac diluţii din 10 în 10, procedîndu-se astfel:

Într-o serie de tuburi sterile se repartizează cîte 4,5 ml bulion, apoi în primul tub se pun 0,5 ml din materialul de examinat şi se omogenizează bine.

Cu altă pipetă gradată se trec 0,5 ml din primul tub în al doilea tub şi se omogenizează. Din al doilea tub se trec 0,5 ml în al treilea tub ş.a.m.d., schimbînd pipeta la fiecare diluţie. Ultima diluţie va fi aceea la care se apreciază că numărul de bacterii este foarte mic.

Din diluţiile executate se fac însămînţări în plăci Petri, introducînd cîte 1 ml din fiecare diluţie într-o placă. Rezultate mai exacte se obţin dacă se însămînţează cîte 2 plăci pentru fiecare diluţie.

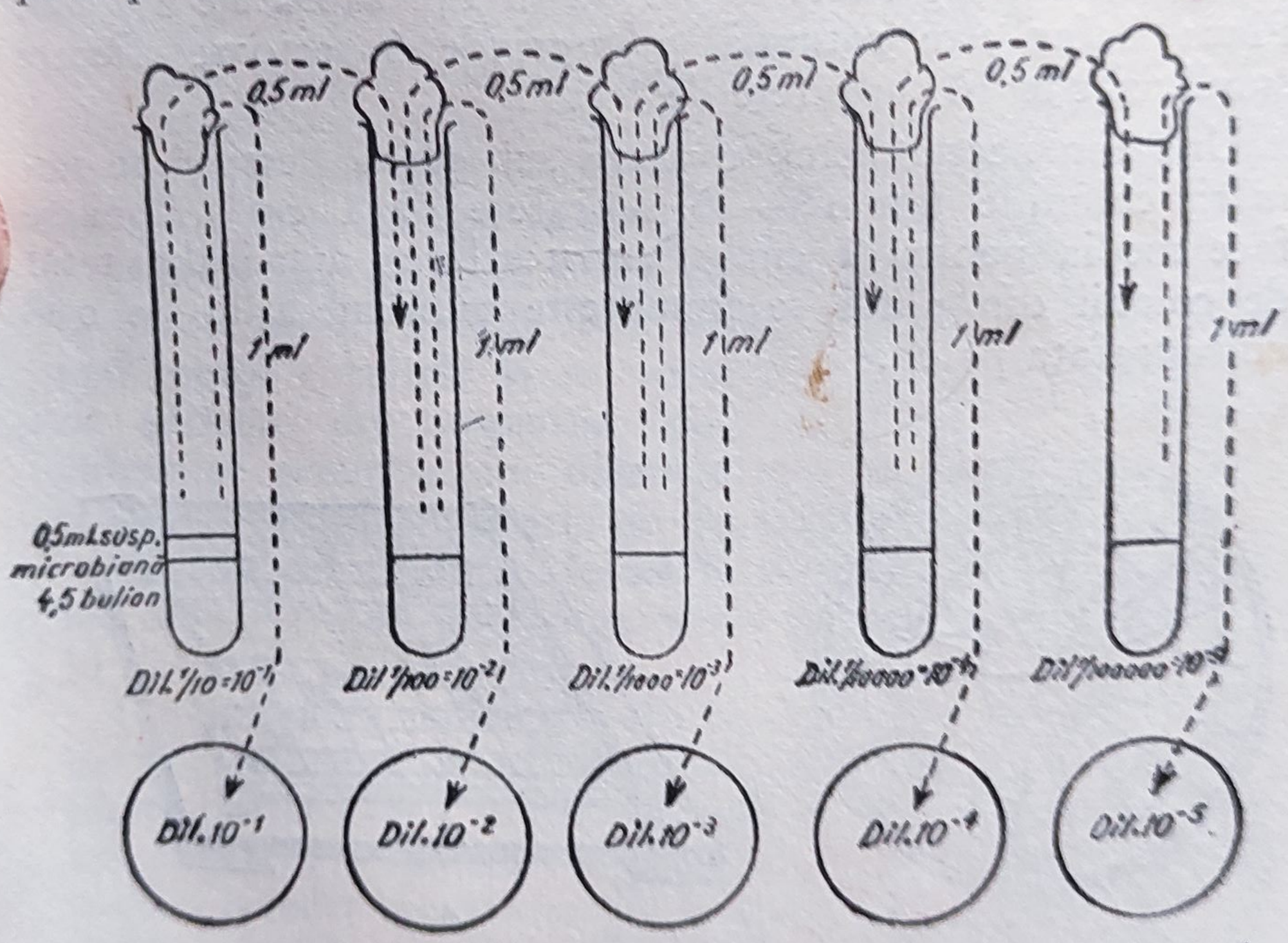


Fig. 11 — Schema executării diluţiilor şi însămînţării pentru metoda numărării bacteriilor în plăci

În fiecare placă, se toarnă apoi peste suspensie agar topit și răcit la 45°C. Se omogenizează bine astfel ca bacteriile să se răspîndească uniform, în vederea obținerii de colonii izolate. Se consideră că o colonie izolată este rezultatul multiplicării unei singure celule bacteriene.

Plăcile însămînțate se pun la termostat și după 24 ore se numără coloniile care au rezultat din fiecare diluție.

Coloniile dezvoltate în plăci se pot număra direct sau cu ajutorul lupei, dacă numărul lor este redus.

Dacă numărul coloniilor din plăci este mare, coloniile se numără cu ajutorul unor plăci prevăzute cu o rețea de pătrate, gravată în sticlă. Dintre plăcile mai frecvent folosite, menționăm plăcile Wolfhügel și Lafar.

Placa Wolfhügel este împărțită în 144 suprafețe a 1 cm^2. Placa Lafar este rotundă și cuprinde 6 sectoare, fiecare subdivizat în 10 suprafețe de 1 cm^2.

Una din aceste plăci se așază sub placa Petri și se numără coloniile din 10—20 suprafețe de 1 cm^2. Apoi se face media pentru 1 cm^2. Pentru aflarea numărului total de colonii din placă se înmulțește numărul aflat pe cm^2 cu suprafața plăcii.

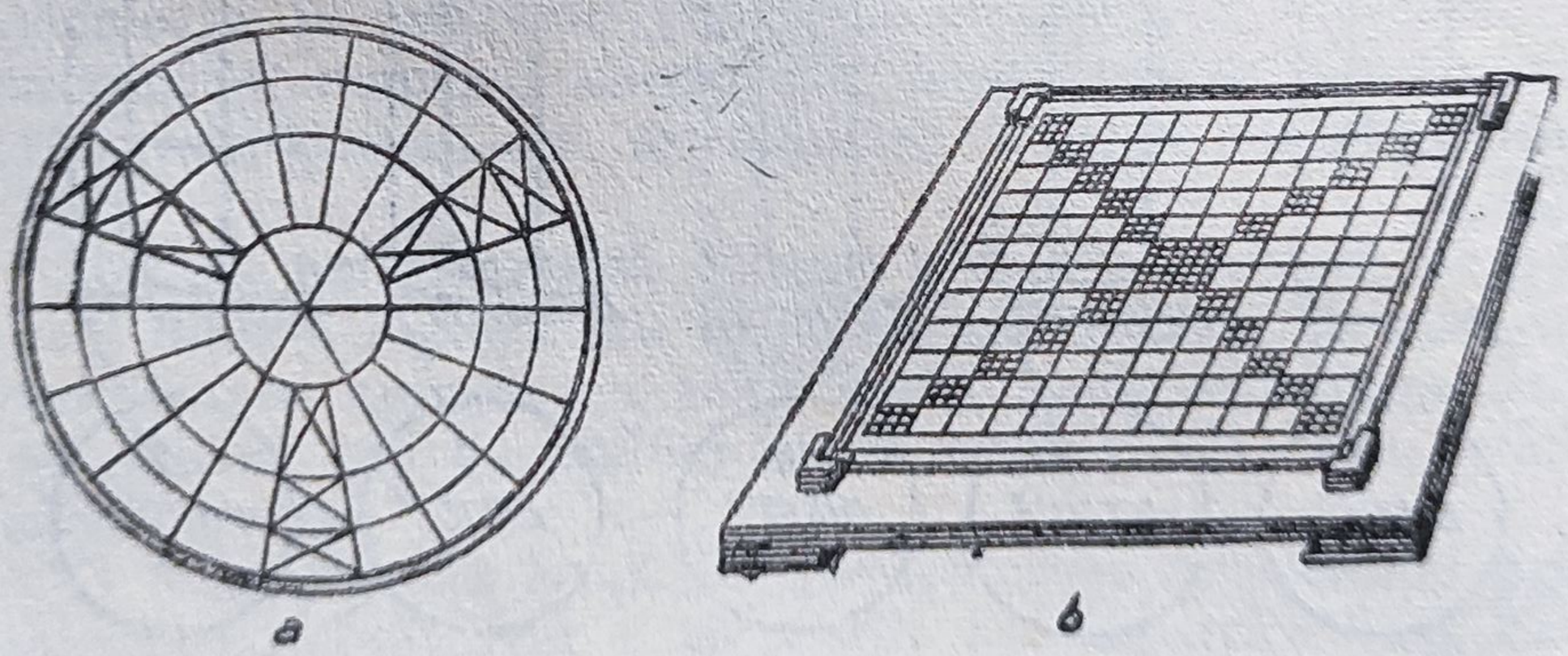


Fig. 12 — Plăci pentru numărători de bacterii:
a — placa Lafar; *b* — placa Wolfhügel

Pentru a se afla numărul de germeni din materialul examinat, se înmulțește numărul coloniilor existent într-o placă cu diluția respectivă. De exemplu, dacă în placa însămînțată cu 1 ml din diluția 1/10 000 s-au dezvoltat 20 colonii, într-un ml din materialul inițial au fost $20 \times 10\,000 = 200\,000$ germeni. Pentru a obține rezultate mai precise, se numără coloniile din mai multe plăci, se înmulțește fiecare cifră aflată cu diluția respectivă și apoi se face media aritmetică.

Metoda diluțiilor. Prin această metodă se determină numărul aproximativ de microorganisme vii, din materialul de examinat, capabile să se multiplice într-un mediu lichid. În principiu se procedează astfel:

Se fac diluții seriate și se însămînțează cîte 1 ml într-un mediu lichid convenabil dezvoltării bacteriilor. După incubare, se notează diluția cea mai mare în care cultura este dezvoltată și pe baza acesteia se apreciază numărul de bacterii din proba inițială folosind tabelele prevăzute în standardele de stat pentru diferite produse.

Metoda are un grad mare de eroare și pentru a se evita pe cît posibil erorile, din fiecare diluție se însămînțează mai multe eprubete și se apreciază numărul aproximativ de germeni din suspensie luînd în considerare numărul culturilor pozitive din ultimele diluții. Cu ajutorul unor tabele se stabilește numărul de bacterii pe unitate de volum.

Metoda diluțiilor se folosește curent pentru determinarea numărului de microorganisme din grupul *coli-aerogenes* în probe de apă și lapte.

Determinarea numărului de bacterii din grupul *coli* prin metoda diluțiilor se bazează pe proprietatea pe care o au aceste bacterii de a fermenta lactoza dintr-un mediu lactozat lichid cu producție de gaze. În acest scop se poate folosi mediul Kessler — Swenarton în eprubete cu tuburi Durham.

De exemplu, pentru stabilirea indicelui *coli* în probe de lapte se procedează astfel: se fac diluții 1/10, 1/100, 1/1000,

1/10 000, 1/100 000. Din fiecare diluţie cît şi din proba de lapte integral se însămînţează cîte trei eprubete cu mediu lactozat (1 ml în fiecare), se incubează la 37°C timp de 48 ore. Dacă nu s-au produs gaze, testul este considerat negativ, dacă fermentarea a avut loc cu producţie de gaz (gazul ocupă cel puţin 1/10 din înălţimea tubului Durham), testul este considerat pozitiv. Se notează numărul eprubetelor pozitive de la ultimele diluţii în care a avut loc fermentarea şi cu ajutorul tabelelor prevăzute în standardele de stat se determină MPN (most probable number = numărul probabil de germeni) din grupul *coli* pe mililitru de lapte.

TEHNICA EXAMINĂRII CARACTERELOR METABOLICE SAU BIOCHIMICE

Un al treilea grup de caractere la care se recurge în scopul identificării bacteriilor îl constituie caracterele biochimice. Ele constau în punerea în evidenţă a echipamentului enzimatic al bacteriilor, diferit de la o specie bacteriană la alta, prin aşa-numitele „reacţii“ sau „teste biochimice“. Pentru executarea lor se folosesc medii, care conţin substraturile faţă de care se impune investigarea activităţii enzimatice.

Punerea în evidenţă a fermenţilor bacterieni prin teste biochimice se rezumă la două categorii de metode mai importante:

1. Metode prin care se urmăreşte în mod direct acţiunea bacteriei asupra unui substrat. În acest caz se observă însăşi modificarea fizică sau chimică a substratului (de ex., lichefierea gelatinei, lichefierea serului coagulat etc).

2. Metode în care nu poate fi observată în mod direct modificarea substratului, dar prin care se pun în evidenţă, cu ajutorul diferiţilor reactivi, metaboliţii rezultaţi din

scindarea substratului în urma acţiunii fermenţilor bacterieni (de ex., triptofanaza nu se pune în evidenţă printr-o modificare vizibilă a triptofanului din mediu, ci prin punerea în evidenţă a indolului, metabolit rezultat din descompunerea triptofanului).

În funcţie de natura fermenţilor bacterieni şi a substraturilor corespunzătoare, reacţiile biochimice pot fi împărţite în cinci grupe:

a) reacţii prin care se pun în evidenţă fermenţii activi faţă de glucide sau polialcooli;

b) reacţii prin care se pun în evidenţă fermenţi activi faţă de substanţe organice, foarte variate din punct de vedere al complexităţii structurale, care conţin azot (de la uree la proteine macromoleculare);

c) reacţii prin care se pun în evidenţă fermenţii bacterieni oxidanţi sau reductori;

d) reacţii care urmăresc posibilitatea folosirii ca sursă de hrană pentru unele specii bacteriene ale anumitor substraturi, care nu pot fi asimilate de alte specii bacteriene;

e) reacţii biochimice complexe.

REACŢII DE PUNERE ÎN EVIDENŢĂ A ACTIVITĂŢII ENZIMATICE FAŢĂ DE GLUCIDE ŞI POLIALCOOLI

În vocabularul curent de laborator, se foloseşte pentru desemnarea glucidelor şi polialcoolilor, termenul de o îndoielnică exactitate ştiinţifică de „zaharuri", iar pentru desemnarea activităţii bacteriilor faţă de acestea, termenul de „proprietăţi zaharolitice" sau „fermentarea zaharurilor".

Numeroase specii bacteriene au proprietatea de a descompune substanţele hidrocarbonate cu formare de aldehide, acizi şi gaze, ca: CO_2, H_2, CH_4. De exemplu, fer-

mentarea glucozei sub acţiunea enzimelor se poate produce conform ecuaţiei:

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{enzimă}} 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Pentru a pune în evidenţă această proprietate, bacteriile se cultivă pe medii lichide sau solide, la care se adaugă substanţele respective şi un indicator al reacţiei mediului.

Substanţele hidrocarbonate frecvent folosite sînt:

Alcooli superiori: — alcooli trivalenţi : glicerol;
— alcooli tetravalenţi : eritritol;
— alcooli pentavalenţi : adonitol;
— alcooli cu 6 atomi : manitol, dulcitol, sorbitol, inozitol.

Glucide:
— pentoze: arabinoza, xiloza, ramnoza;
— hexoze: glucoza (dextroza), levuloza (fructoza), manoza, galactoza;
— dizaharide: maltoza, lactoza, zaharoza;
— trizaharide: rafinoza;
— polizaharide : inulina, amidonul, glicogenul.

Glicozide: — salicina, esculina.

Tehnica punerii în evidenţă a proprietăţilor fermentative ale bacteriilor este variată. Se pot întrebuinţa în acest scop medii lichide sau solide.

Medii lichide folosite mai frecvent sînt apa peptonată la care se adaugă soluţia de substanţă hidrocarbonată în proporţie de 0,5—1% şi un indicator şi mediul Hiss cu indicator Andrade.

Examinarea proprietăţilor zaharolitice în apa peptonată cu albastru de bromtimol. Apa peptonată se prepară astfel: la 100 ml de apă se adaugă peptonă 2 g şi clorură de sodiu 0,5 g. Se încălzeşte la 80—90°C pentru dizolvarea substanţelor adăugate.

Se alcalinizează și se încălzește 15 minute la 115°C, apoi se filtrează și se sterilizează 20 minute la 112—115°C.

La mediul astfel preparat se adaugă, în condiții sterile, soluțiile de substanțe hidrocarbonate care au fost preparate în prealabil, dizolvînd substanța respectivă în apă distilată în proporție de 10% și au fost sterilizate prin tindalizare (cîte o oră la 100°C, 3 zile consecutiv). Substanțele hidrocarbonate se pot adăuga și înainte de sterilizarea apei peptonate, în acest caz însă mediul se sterilizează prin tindalizare.

Ca indicator se folosește soluția de albastru de bromtimol (pentru 1 l apă peptonată se adaugă 12 ml din soluția preparată din: 1 g albastru bromtimol + 25 ml NaOH n/10 + 475 ml apă distilată). Indicatorul se poate adăuga după dezvoltarea bacteriilor în momentul citirii rezultatului, introducînd în cultură 2—3 picături. Dacă se urmărește reacția mai mult timp, se preferă ca indicatorul să se adauge la apa peptonată înainte de sterilizarea mediului. → vireaza in galben. ?

● **Examenul proprietăților zaharolitice în mediul Hiss cu indicator Andrade.** Mediul Hiss se prepară astfel:

La 1400 ml apă se adaugă 7 g peptonă și 1,4 g PO_4HNa_2 și se ajustează pH-ul la 7,8. Se fierbe, se filtrează prin hîrtie de filtru și se sterilizează la autoclav cu capacul neînșurubat, în vapori de apă, la 100°C. După sterilizare, se adaugă 11 ml din soluția sterilă de indicator Andrade. La acest mediu se adaugă soluțiile de zaharuri, astfel încît concentrația finală în mediu să fie de 1%.

Indicatorul Andrade se prepară astfel: la 100 ml apă distilată se adaugă 0,5 g fucsină acidă și 16 ml soluție normală NaOH, pînă la decolorare. Adăugarea soluției de NaOH se face picătură cu picătură. Indicatorul se sterilizează prin autoclavare 30 minute, la 115°C.

Mediul Hiss cu indicator Andrade este incolor. În urma fermentării substanţei hidrocarbonate din mediu, culoarea indicatorului virează în roşu.

Unele bacterii fermentează substanţele hidrocarbonate cu producţie de gaz. Pentru a pune în evidenţă acest caracter în mediile lichide amintite, se introduc, înainte de sterilizare, tuburi mici (Durham) cu gura în jos. În cazul cînd reacţia are loc cu producere de gaz, în tubul Durham se acumulează bule de gaz.

Activitatea fermentativă faţă de o substanţă hidrocarbonată poate fi determinată şi sub aspect cantitativ. În acest scop se titrează cantitatea de acid rezultată în mediu, prin neutralizare, cu o soluţie normală de hidroxid de sodiu. În funcţie de cantitatea de hidroxid de sodiu, consumată pentru neutralizare, se calculează cantitatea de acid, formată în urma dezintegrării substanţei hidrocarbonate.

În acelaşi scop se poate recurge şi la determinarea electrometrică a pH-ului sau la determinarea colorimetrică a pH-ului final cu hîrtie indicator universal sau cu comparatorul Hellige.

Mediile solide întrebuinţate pentru a examina proprietăţile fermentative ale bacteriilor, fiind folosite în majoritatea cazurilor ca medii de diagnostic diferenţial, au fost descrise la mediile speciale de cultură (vezi pag. 243, 248).

Testul de hidroliză a amidonului. Bacteriile se însămînţează în placa cu geloză care conţine 0,2% amidon solubil. După dezvoltarea culturii, suprafaţa mediului se acoperă cu soluţie Lugol sau soluţie saturată de iod (20 g iod şi 100 ml alcool etilic de 50°). Mediul se colorează în albastru-violaceu, datorită prezenţei amidonului, dar în jurul coloniei cu bacterii care au hidrolizat amidonul se observă zone necolorate.

Mediul Hiss cu indicator Andrade este incolor. În urma fermentării substanței hidrocarbonate din mediu, culoarea indicatorului virează în roșu.

Unele bacterii fermentează substanțele hidrocarbonate cu producție de gaz. Pentru a pune în evidență acest caracter în mediile lichide amintite, se introduc, înainte de sterilizare, tuburi mici (Durham) cu gura în jos. În cazul cînd reacția are loc cu producere de gaz, în tubul Durham se acumulează bule de gaz.

Activitatea fermentativă față de o substanță hidrocarbonată poate fi determinată și sub aspect cantitativ. În acest scop se titrează cantitatea de acid rezultată în mediu, prin neutralizare, cu o soluție normală de hidroxid de sodiu. În funcție de cantitatea de hidroxid de sodiu, consumată pentru neutralizare, se calculează cantitatea de acid, formată în urma dezintegrării substanței hidrocarbonate.

În același scop se poate recurge și la determinarea electrometrică a pH-ului sau la determinarea colorimetrică a pH-ului final cu hîrtie indicator universal sau cu comparatorul Hellige.

Mediile solide întrebuințate pentru a examina proprietățile fermentative ale bacteriilor, fiind folosite în majoritatea cazurilor ca medii de diagnostic diferențial, au fost descrise la mediile speciale de cultură (vezi pag. 243, 248).

Testul de hidroliză a amidonului. Bacteriile se însămînțează în placa cu geloză care conține 0,2% amidon solubil. După dezvoltarea culturii, suprafața mediului se acoperă cu soluție Lugol sau soluție saturată de iod (20 g iod și 100 ml alcool etilic de 50°). Mediul se colorează în albastru-violaceu, datorită prezenței amidonului, dar în jurul coloniei cu bacterii care au hidrolizat amidonul se observă zone necolorate.

REACŢII DE PUNERE ÎN EVIDENŢĂ A ACTIVITĂŢII ENZIMATICE FAŢĂ DE SUBSTANŢE ORGANICE CE CONŢIN AZOT

Testul de hidroliză a ureei. Proprietatea unor specii bacteriene de a hidroliza ureea se pune în evidenţă pe diferite medii de cultură, lichide sau solide, care conţin ca substrat uree, cum este mediul Christensen.

Mediul Christensen:

— glucoză	1	g
— peptonă	1	g
— NaCl	5	g
— KH_2PO_4	2	g
— roşu fenol	0,012	g
— fibre de agar	20	g
— apă distilată	1 000	ml

ph-ul se ajustează la 6,8.

Mediul se sterilizează, după care se adaugă înainte de solidificare 20 ml dintr-o soluţie de uree 20%, sterilizată prin filtrare. După repartizare în tuburi, mediul se pune la solidificat în poziţie înclinată. Datorită reacţiei slab acide mediul are o culoare albă-gălbuie.

În urma însămînţării unei bacterii care hidrolizează ureea, mediul, iniţial galben, se colorează în roşu, datorită virării roşului fenol în prezenţa amoniacului, metabolit rezultat din descompunerea ureei.

Metode pentru punerea în evidenţă a produşilor rezultaţi din dezintegrarea unor aminoacizi

Metode pentru punerea în evidenţă a indolului. Unele bacterii cultivate în bulion sau apă peptonată au proprietatea de a dezintegra triptofanul. Triptofanaza oxidează lanţul lateral al triptofanului, rezultînd indolul. Ca me-

diu de cultură pentru punerea în evidenţă a indolului se preferă apa peptonată fără zaharuri, pentru că uneori în bulion sau în apă peptonată cu zaharuri nu se obţin rezultate, chiar dacă bacteria este indoligenă.

Punerea în evidenţă a indolului prin reacţia Salkovski: la cultura în mediul lichid (aproximativ 10 ml) se adaugă 1 ml soluţie de nitrit de potasiu 0,02% şi apoi acid sulfuric. În cazul reacţiei pozitive mediul se colorează în roşu.

Punerea în evidenţă a indolului cu diferiţi reactivi: se cultivă germenul de examinat în apă peptonată, după care se adaugă cîteva picături dintr-unul din reactivii indicaţi în tabelul 32, care îşi modifică culoarea în prezenţa indolului.

Răspîndirea cea mai mare o are întrebuinţarea reactivului în formula propusă de K o v a c s.

În prezenţa indolului, reactivul se colorează în roşu.

Punerea în evidenţă a indolului cu hîrtie indicator: se taie fîşii de hîrtie de filtru, care se îmbibă cu unul din reactivii indicaţi în tabelul 32. Benzile se usucă şi se păstrează folosindu-se după nevoie.

Metode pentru a pune în evidenţă producţia de H_2S. H_2S este un produs rezultat din dezintegrarea aminoacizilor care conţin sulf (cistina, cisteina etc.) sub acţiunea fermenţilor unor bacterii. Producţia de H_2S se pune în evidenţă prin următoarele metode:

Metoda cultivării pe medii cu acetat de Pb. La 100 ml agar nutritiv se adaugă 1 g de acetat de Pb. Mediul se repartizează în tuburi, se sterilizează. Bacteriile se însămînţează pe suprafaţa mediului înclinat sau în plăci Petri. Dacă germenul produce H_2S mediul se înnegreşte în jurul coloniei, datorită sulfurii de Pb care rezultă din combinarea H_2S şi a acetatului de Pb.

Metoda benzilor cu acetat de Pb. Se îmbibă benzi de hîrtie de filtru lungi de 5—6 cm şi late de 1 cm cu o solu-

TABELUL 32

Reactivi pentru punerea în evidenţă a indolului (după Hallmann, 1961)

Componenţi	Reactivul Ehrlich Böhme	Modificat Pringsheim	Modificat Kovacs	Reactivul Kovacs Hoffman	Soluţie pentru impregnarea hîrtiei reactiv
Para-dimetil-amino benzaldehidă	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0
Alcool metilic	—	10,0	—	—	50,0
Alcool etilic 95%	95,0	—	—	—	—
Alcool amilic chimic pur	—	—	75,0	—	plus 10,0 acid fosforic
Alcool butilic	—	—	—	75,0	
Acid clorhidric	20,0	8,0	25,0	25,0	
Cantitatea de reactiv necesară pentru 5 ml cultură în apă peptonată	3 picături	3 picături	3 picături	1 ml	

ţie 10% de acetat de Pb. Se usucă, se introduc în tuburi sau baloane şi se sterilizează la autoclav. Banda pregătită astfel se introduce în tubul cu mediul lichid imediat după însămînţarea germenului de examinat, fixîndu-se cu dopul de vată aproximativ la 1 cm de la suprafaţa mediului. Dacă bacteria produce H_2S, banda se înnegreşte în porţiunea inferioară după 24 de ore sau mai multe zile de incubare la 37°C.

3. Comportarea bacteriilor față de cazeină

În acest sens se aplică în practica bacteriologică testele descrise mai departe.

Testul cultivării bacteriilor în lapte turnesolat. Pentru a fi însămînțat laptele se prepară astfel: se degresează la separator sau lăsîndu-l într-un vas și se înlătură smîntîna ridicată la suprafață. Pentru a urmări modificările de pH se adaugă o soluție apoasă sterilă de turnesol 10%, pînă cînd se obține o culoare violetă.

Se repartizează în eprubete, se sterilizează prin tindalizare la 100°C cîte 30 minute, sau la 110°C o singură dată, timp de 20 minute; Nu se sterilizează la 115°C, pentru că la această temperatură cazeina se peptonizează, iar lactoza se caramelizează și mediul capătă o culoare galbenă. Se pot deosebi diverse aspecte în ceea ce privește comportarea bacteriilor în acest mediu și anume:

— dezvoltarea fără modificarea mediului;

— dezvoltarea însoțită de coagularea laptelui fără acidifiere;

— dezvoltarea însoțită de coagulare și acidifiere;

— dezvoltarea însoțită de alcalinizare datorită producerii de amine și amoniac.

Testul de hidroliză a cazeinei. Pentru a se pune în evidență hidroliza cazeinei se folosește geloza-lapte. La geloza repartizată în tuburi, sterilizată și lichefiată, se adaugă lapte steril, smîntînit, în cantitate de 1—2 ml lapte la 10 ml mediu. Amestecul se repartizează în plăci Petri. Germenii se însămînțează în suprafață. Dacă aceștia au proprietăți proteolitice, cazeina din lapte se peptonizează și în jurul coloniilor mediul se clarifică.

Testul cu bromcrezol purpur (test Hottis și Miller). Pentru identificarea unor bacterii se folosește testul cu bromcrezol purpur: la 9,5 ml lapte se adaugă 0,5 ml soluție

apoasă 0,5% sterilă de bromcrezol purpur. Amestecul are iniţial culoare roşie. Se incubează laptele 24 de ore la 37°C. Dacă bacteriile existente în lapte fermentează lactoza, mediul se acidifică şi culoarea virează spre galben.

Testul se foloseşte pentru diferenţierea streptococilor din lapte: *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* şi *Str. uberis*. Toate aceste specii fermentează lactoza, dar în cazul *Str. agalactiae* apar puncte galbene pe pereţii şi pe fundul eprubetei, care corespund grămezilor de streptococi ce se dezvoltă aglutinat, iar în cazul celorlalte specii culoarea mediului se modifică în totalitate, germenii dezvoltîndu-se uniform în toată masa mediului.

Reacţii de punere în evidenţă a proprietăţilor proteolitice

Proprietatea pe care o prezintă unele bacterii de a descompune substanţele proteice se poate pune în evidenţă prin testele descrise mai departe.

Testul de gelatinoliză. Se prepară un mediu cu gelatină care se găseşte în comerţ sub formă de foi subţiri. Adăugate la bulion în proporţie de 10—15% îi conferă o consistenţă solidă la temperaturi pînă la 22°C. Temperatura de topire a gelatinei (soluţie 10%) trebuie să fie de 32—34°C, iar punctul de solidificare nu trebuie să fie mai scăzut de 22—26°C. Gelatina inferioară se solidifică la temperaturi mai mici de 17—18°C. Consistenţa gelatinei solidificate depinde şi de reacţia mediului; astfel, la pH —6,5 gelatina se solidifică cu greutate, iar la pH-7,7 de multe ori nu se mai solidifică.

Acest mediu, introdus în 1881 de către K o c h, a fost primul mediu solid folosit în bacteriologie.

În prezent, se utilizează la punerea în evidenţă a proprietăţilor proteolitice.

Se prepară astfel:

La bulionul gata preparat și încălzit la 55°C se adaugă foiță cu foiță 10—15 g gelatină pentru 100 ml mediu. Tot la temperatura de 55°C se pune picătură cu picătură, pentru fiecare litru de mediu, un amestec dintr-un albuș de ou și 50 ml apă.

Se omogenizează bine și se încălzește la 115°C. Albușul se coagulează și antrenează toate substanțele nedizolvate din mediu, clarificîndu-l.

Se filtrează prin vată, se distribuie în tuburi și se sterilizează la 110°C timp de 20 minute. Se lasă să se solidifice în poziție verticală.

Pentru a se ridica punctul de topire al gelatinei se poate folosi metoda lentă de preparare (Roux), care constă în încălzirea mediului la 100°C în loc de 115°C și sterilizarea prin tindalizare (100°C, 3 zile).

Mediul se însămînțează prin înțepare, introducînd acul drept în centrul coloanei, astfel ca să ajungă pînă la fundul tubului. Culturile se așază în poziție verticală la temperatura de 20—22°C și se controlează caracterul creșterii și al lichefierii la diferite intervale de timp.

Astfel poate avea loc creșterea fără lichefiere sau creștere cu lichefiere, deosebindu-se diferite aspecte.

Citirea se face, în general, de trei ori: în prima zi, a zecea și a douăsprezecea zi.

Dacă microbul nu se dezvoltă la 20°C, poate fi cultivat în gelatină la 37°C. În acest caz, pentru citirea rezultatului, eprubeta se răcește introducînd-o la frigider, notîndu-se apoi gradul de lichefiere în comparație cu mediul neînsămînțat.

Examenul proprietăților gelatinolitice se poate executa și folosind *mediul Frazier* (agar-gelatină) și un reactiv pe bază de $HgCl_2$.

Compoziţia mediului: geloză nutritivă cu 0,4% gelatină, pH-7,2. Sterilizare prin autoclavare timp de 20 minute la 115°C.

Compoziţia reactivului:

— clorură mercurică	15 g
— acid clorhidric concentrat	20 ml
— apă distilată	100 ml

Tehnica de lucru: mediul se toarnă în cutia Petri şi se însămînţează în suprafaţă, se incubează 2—14 zile. Se acoperă cultura cu 8—10 ml din reactiv.

Rezultat: gelatina nehidrolizată formează cu reactivul adăugat un precipitat alb opac. Gelatina hidrolizată apare ca o zonă clară în jurul coloniilor.

Testul de lichefiere a serului coagulat. Se întrebuinţează pentru a pune în evidenţă proprietăţile proteolitice ale bacteriilor. Mediul se prepară astfel:

Serul recoltat în mod aseptic se distribuie în tuburi sterile, apoi se coagulează la 70—75°C în coagulator, punînd tuburile în poziţie înclinată. După coagulare, mediul capătă o culoare albă-cenuşie.

Bacteriile se dezvoltă pe suprafaţă, iar proteoliza se manifestă prin lichefierea şi formarea depresiunilor pe suprafaţa mediului în dreptul coloniilor.

Testul lecitinazei. Mediul solid: la agarul nutritiv cu adaos de 1% clorură de sodiu se adaugă în momentul folosirii 10% emulsie gălbenuş de ou (preparat din gălbenuş de ou recoltat steril şi un volum egal de soluţie fiziologică sterilă). Mediul se toarnă în plăci şi se însămînţează în suprafaţă. Incubare 1—4 zile la 37°C.

Rezultat: în cazul hidrolizei lecitinei din gălbenuş de ou, apare o zonă opacă în jurul coloniei bacteriene.

Mediul lichid: bulion nutritiv cu adaos de 1% clorură de sodiu şi 10% emulsie gălbenuş de ou. Incubare la temperatură optimă, timp de 1—4 zile.

Rezultat: activitatea lecitinazică se traduce prin opacifierea mediului şi uneori cu formarea unui precipitat.

TESTE PRIN CARE SE PUN ÎN EVIDENŢĂ FERMENŢII BACTERIENI OXIDANŢI SAU REDUCTORI

Reacţii de reducere a unor substanţe colorante. Unele bacterii au proprietatea de a decolora (reduce) anumiţi coloranţi organici, transformîndu-i în leucobaze incolore care ulterior în prezenţa oxigenului redobîndesc culoarea iniţială. În vederea executării acestei probe se pot întrebuinţa următoarele substanţe colorante: albastrul de metilen, verdele de malachit, verdele lui Janus, indigo-carmin, molibdat de amoniu. Mai frecvent se întrebuinţează albastrul de metilen, procedîndu-se astfel:

La 5 ml cultură în bulion de 24 de ore în tub sau într-o fiolă se adaugă o picătură din soluţia apoasă de albastru de metilen 1%. Dacă proba se execută în tub, după omogenizare se acoperă suprafaţa mediului cu cîteva picături de oleu de parafină, iar dacă se face în fiolă aceasta se închide la flacără pentru a împiedica pătrunderea oxigenului.

Reacţia reducerii albastrului de metilen se examinează după 1—24 ore de menţinere la termostat.

Decolorarea completă indică o reacţie pozitivă, coloraţia verde o reacţie slab pozitivă şi lipsa decolorării o reacţie negativă.

Reacţia Voges-Proskauer sau reacţia acetil-metil-carbinolului. Acetil-metil-carbinolul este un metabolit, care rezultă din descompunerea de către bacterii a 2,3 butilenglicolului, printr-o reacţie de oxidare. Decelarea acetil-metil-carbinolului în mediu se face astfel:

Se cultivă bacteria de examinat în mediul Clark şi Lubs cu următoarea compoziţie:

— peptonă . . . . . 5 g
— glucoză . . . . . 5 g
— fosfat bipotasic . . . . . 2 g
— apă distilată . . . . . 1 000 ml

La cultura de 5 zile se adaugă un volum egal de hidroxid de potasiu 10%. Se ţin tuburile sub observaţie timp de 6 ore, la 37°C. În cazul reacţiei pozitive, apare în acest interval de timp o culoare roşie.

Reacţia roşului metil. Se execută în acelaşi mediu ca reacţia Voges-Proskauer. La 5 ml cultură de 5 zile se adaugă 5 picături dintr-un reactiv constituit din 0,1 g roşu metil, 300 ml alcool şi 500 ml apă distilată. În cazul reacţiei pozitive mediul se colorează în roşu, în cazul reacţiei negative în galben.

Testul catalazei. Se poate face, folosind culturi pe medii solide sau lichide. În cazul culturii în medii lichide se amestecă 5 ml din cultura în bulion triptic de 24 de ore, cu 3 ml soluţie H_2O_2 3%. În cazul reacţiei pozitive se produce o efervescenţă (degajare pronunţată de oxigen) în timp de 1—2 minute. Reacţia devine mai evidentă dacă înaintea soluţiei de H_2O_2 se adaugă în prealabil, la cultura în bulion, o cantitate egală dintr-o soluţie 10% de săpun.

Testul oxidazei. Cultura de 2—4 zile pe mediu solid se acoperă cu soluţie apoasă 1% de tetrametylparafenilendiamin-hidroclorid, preparată proaspăt.

Rezultat: coloniile bacteriilor oxidazo-pozitive se colorează în roz-roşu purpuriu-brun pînă la negru în timp de 15 minute.

Reacţia de reducerea nitraţilor în nitriţi (testul de denitrificare). Bacteriile care au proprietatea de a reduce nitraţi, transformă, prin enzimele ce le posedă, nitraţii în nitriţi. Pentru a pune în evidenţă această proprietate, bacteriile se cultivă în bulion la care se adaugă nitrat de potasiu (NO_3K) 0,2% sau într-un mediu cu următoarea compoziţie:

peptonă . . . . . 10 g
— NO_3K . . . . . 10 g
— apă distilată . . . . . 1 000 ml

După încălzirea mediului în scopul dizolvării substanţelor acesta se sterilizează prin tindalizare.

Mediile însămînţate se controlează după 3—5 zile de incubare, adăugînd cîte 5 picături din doi reactivi (Griess-Ilosvay).

Reactiv 1:

— alfa-naphtilamină . . . . . 1 g
— apă distilată . . . . . 22 ml

Se încălzeşte, se filtrează şi se adaugă acid acetic glacial 1 ml, diluat (400 ml în 700 ml apă distilată).

Reactiv 2:

— acid sulfanilic . . . . . 0,5 g
— acid acetic diluat . . . . . 150 ml

În cazul reacţiei pozitive, după adăugarea reactivilor, mediul se colorează în roşu, dacă însă n-a avut loc reducerea, mediul nu-şi modifică culoarea.

TESTE PRIN CARE SE PUNE ÎN EVIDENŢĂ POSIBILITATEA METABOLIZĂRII ANUMITOR SUBSTANŢE

Aceste teste se bazează pe însămînţarea bacteriilor pe medii speciale, care conţin un anumit substrat. După cum bacteria se dezvoltă, sau nu, se trag concluzii privind posibilitatea folosirii ca sursă de hrană a substratului respectiv. Astfel de teste sînt folosite îndeosebi pentru diferenţierea enterobacteriaceelor. Cel mai frecvent sînt utilizate următoarele:

Testul folosirii ca unică sursă de carbon a citratului de sodiu (mediul Simmons) sau amoniu. Mediul de cultură are următoarea compoziţie:

— clorură de sodiu	5	g
— sulfat de magneziu	0,2	g
— fosfat de amoniu biacid	1	g
— fosfat bipotasic	1	g
— citrat de amoniu (sau sodiu) cristalizat	2,77	g
— apă distilată	1 000	ml
— geloză	20	g

Amestecul se încălzeşte pînă la topirea gelozei, se ajustează pH—7,2, se adaugă 10 ml soluţie alcoolică 1,5% de albastru de bromtimol. Se sterilizează timp de 15 minute la 120°C. Bacteriile capabile să metabolizeze citratul de sodiu sau amoniu, dau culturi pozitive şi alcalinizează mediul virînd culoarea din verzui în albastru intens.

Testul metabolizării KCN (Braun). Compoziţia mediului:

— peptonă	10	g
— NaCl	5	g
— Na_2HPO_4	5,637	g
— KH_2PO_4	0,226	g
— agar	20	g
— apă distilată	1 000	ml

pH-7,4—7,6; sterilizare prin autoclavare. În momentul întrebuinţării se adaugă la mediul topit şi răcit la 50°C cîte 0,1 ml soluţie 1/200 KCN pentru 2,2 ml mediu (repartizat în prealabil în tuburi). Tuburile se ţin cîteva minute în baie de apă la 45°C pentru omogenizare, apoi se însămînţează. În cazul metabolizării KCN cultura se dezvoltă formînd inel alburiu la suprafaţă.

Testul utilizării malonatului de sodiu. Mediul lichid de cultură (bulionul cu malonat de sodiu) are următoarea compoziţie:

— extract de drojdie	1	g
— sulfat de amoniu	2	g
— fosfat bipotasic (PO_4K_2H)	0,6	g

— fosfat monopotasic (PO_4KH_2) . . 0,4 g
— clorură de sodiu . . . . . 2 g
— malonat de sodiu . . . . . 3 g
— albastru bromtimol . . . . . 0,025 g
— apă distilată . . . . . 1 000 ml

pH-7; se distribuie cîte 5 ml în tuburi; sterilizare 15 minute la 120°C. În cazul metabolizării malonatului de sodiu, bacteria se dezvoltă și acidifică mediul.

Teste prin care se pune în evidență comportarea enterobacteriaceelor față de unii acizi organici sau sărurile lor (dextro-tartrat, mucat etc.). Compoziția mediului:

— lactopeptonă Difco . . . . . 10 g
— NaOH n/10 . . . . . 8,5 g
— apă distilată . . . . . 1 000 ml
— albastru de bromtimol 1/500 . . . 12 ml

La mediu, se adaugă unul din următorii acizi organici în soluții ajustate la pH-7,4 cu NaOH n/5:

— dextrotartrat (tartrat de sodiu-potasiu) în proporție de 1%
— levotartrat (acid tartric) în proporție de 0,5%
— mucat (acid mucic) în proporție de 1%.

Sterilizare prin autoclavare la 105°.

După însămînțare se incubează 15 zile.

Interpretare: modificarea culorii și aprecierea precipitatului apărut în urma adăugării de 0,5 ml soluție saturată de acetat de plumb la 3—4 ml mediu. În cazul reacției pozitive culoarea virează de la albastru la verde-galben și apare un precipitat mic; în cazul reacției negative culoarea nu se modifică, dar apare un precipitat voluminos după adăugarea acetatului.

TESTE BIOCHIMICE COMPLEXE

Testul de hemoliză. Unele bacterii prin enzimele lor dezintegrează globulele roșii ale diferitelor specii animale. Examinarea acestei proprietăți se poate face pe medii li-

chide sau solide. Mai frecvent se foloseşte geloza-sînge care se prepară astfel: la agarul topit şi răcit la 45°C se adaugă sînge defibrinat steril, în proporţie de 1—10%. Temperatura mediului să nu fie mai ridicată, pentru că sîngele se închide la culoare. Însămînţarea se face în plăci.

Bacteriile, în urma multiplicării pe medii cu sînge, pot produce următoarele aspecte:

— dezvoltarea fără schimbarea aspectului mediului (bacterii nehemolitice);

— dezvoltarea însoţită de decolorarea şi clarificarea mediului în dreptul şi pe diferite distanţe în jurul coloniilor. Această modificare corespunde unui proces de hemoliză şi hemodigestie (hemoliza beta). Mărimea zonei de hemoliză din jurul coloniilor este în funcţie de cantitatea de hemolizine secretate de bacterie şi de gradul lor de activitate;

— dezvoltarea însoţită de colorarea în verde a mediului în dreptul şi în jurul coloniilor. Această modificare corespunde transformării hemoglobinei în methemoglobină sub acţiunea H_2O_2 produs de bacterie (efect viridans sau hemoliza alfa).

• **Testul CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen).** Se bazează pe proprietatea pe care o au unele bacterii (de ex. *Str. agalactiae*) de a liza globulele roşii de oaie pe medii însămînţate în prealabil cu un stafilococ beta hemolitic.

Proba se execută prin însămînţare de-a lungul diametrului unei plăci Petri cu geloză — sînge oaie a unei tulpini de stafilococ beta hemolitic. Apoi se însămînţează perpendicular tulpina bacteriană de identificat. Reacţia pozitivă se traduce prin apariţia unei zone de hemoliză netă în zona de hemoliză mai slabă, proprie stafilococului.

• **Testul de coagulare a plasmei citratate.** Materialele necesare sînt: a) plasma citratată de iepure care se obţine în felul următor: se recoltează sînge de la un iepure din

EXTEMPORANEU.

vena auriculară sau prin puncţia cordului şi se amestecă în părţi egale cu o soluţie de 2% citrat de sodiu în apă fiziologică. Se lasă să se sedimenteze globulele roşii sau se centrifughează după care se decantează plasma; b) o cultură în bulion de 24 de ore din tulpina de stafilococ de examinat.

— Executarea reacţiei: cu o pipetă gradată se iau 0,9 ml plasmă citratată care se repartizează într-un tub Wassermann şi se adaugă 0,1 ml din cultura în bulion de 24 de ore de stafilococ. Tubul se pune la termostat la 37°C şi se examinează din oră în oră.

— Interpretarea reacţiei se face pe baza modificării consistenţei plasmei citratate.

Acest test se practică pentru aprecierea patogenităţii tulpinilor de stafilococ, pe baza prezenţei stafilochinazei sau coagulazei la tulpinile patogene; tulpinile nepatogene nu secretă acest ferment. O tulpină de stafilococ este considerată patogenă atunci cînd coagulează plasma citratată de iepure în 1—3 ore şi nepatogenă atunci cînd produce coagularea într-un timp mai îndelungat sau deloc.

Metode de examinare concomitentă a mai multor însuşiri ale bacteriilor prin folosirea mediilor politrope

Utilizarea lor se impune cel mai frecvent pentru diagnosticul diferenţial al enterobacteriaceelor.

Mediul SIM (producţie de H_2S, indol, mobilitate):

— extract carne	3	g
— peptonă	30	g
— citrat de fier amoniacal	0,2	g
— tiosulfat sodiu	0,025	g
— agar	3	g
— apă distilată	1 000	ml

Se dizolvă în apă prin fierbere. Se repartizează cîte 1,5 ml în tuburi mici. După sterilizare se solidifică în poziţie verticală.

Se însămînţează prin înţepare. Producţia de indol se poate controla introducînd o fîşie de hîrtie de filtru îmbibată cu acid oxalic soluţie saturată sau acoperind suprafaţa mediului cu 2 ml cloroform şi 2 ml reactiv Kovacs.

Interpretare: H_2S+ — se înnegreşte de-a lungul liniei însămînţării; indol pozitiv — se înroşeşte hîrtia de filtru (sau reactivul adăugat); mobilitate + : cultura se răspîndeşte în mediu; mobilitate — : cultura numai pe linia însămînţării.

Mediul uree-indol. Compoziţie:

— PO_4KH_2	0,1 g
— L-triptofan	0,3 g
— PO_4K_2H	0,1 g
— ClNa	0,5 g
— uree	2 g
— alcool 95°	1 ml
— roşu fenol 1%	0,25 ml
— apă distilată	100 ml

pH-6,5—6,7.

Mediul se repartizează în cantitate de 1,5 ml în tuburi mici Wassermann şi se sterilizează.

Însămînţarea se face abundent din cultură pe mediu solid. Incubarea culturilor 24 ore la 37°C.

Interpretarea: ureazǎ + : mediul devine alcalin şi virează culoarea din galben în roşu-violaceu;

ureazǎ — : culoarea nu se modifică.

Pentru producţia de indol se adaugă cîteva picături reactiv Ehrlich Kovacs la cultura dezvoltată sau se introduce imediat după însămînţare o bandă de hîrtie de filtru impregnată cu indicator pentru indol. În cazul reacţiei pozitive, apare inelul roşu (dacă se foloseşte reactivul) sau hîrtia se înroşeşte în partea inferioară.

Mediul manitol mobilitate. Compoziţie:

— peptonă tripsică	20 g
— geloză	4,5 g
— manitol	2 g
— nitrat potasiu	1,5 g
— roşu fenol 1%	4 ml
— apă	1 000 ml

pH-7,2—7,3; se repartizează cîte 2 ml în tuburi reacţie.

După sterilizare se lasă să se solidifice în poziţie verticală. Însămînţarea se face prin înţepare, introducînd ansa pînă la fundul tubului. Incubare la 37°C.

Interpretare:

— mobilitate +: cultura difuzează în mediu;
—: cultura se dezvoltă numai de-a lungul liniei de însămînţare;

— fermentarea manitolului +: culoarea virează în galben;
—: culoarea nu se schimbă (rămîne roşie).

Se poate examina în acelaşi mediu şi reducerea nitraţilor adăugînd la suprafaţa mediului reactiv Griess-Ilosvay.

Mediul lactoză-glucoză-H_2S.

— peptonă tripsică	20 g
— ClNa	5 g
— lactoză	10 g
— glucoză	1 g
— hiposulfit sodiu	0,2 g
— sulfat de fier amoniacal	0,3 g
— roşu fenol 1%	2,5 ml
— geloză	17 g
— apă	1 000 ml

pH-7,2—7,3; se repartizează 2—3 ml în tuburi Wassermann.

După sterilizare se solidifică în poziţie înclinată, astfel ca să rămînă la fundul tubului o porţiune neînclinată de 1—2 cm înălţime.

Însămînţarea în porţiunea neînclinată se face prin înţepare, iar în porţiunea înclinată în striuri (linii paralele)

dese ca să se obţină o cultură abundentă. Încubare la 37°C, timp de 24 ore.

Interpretare:

Fermentarea glucozei +: în porţiunea dreaptă culoarea virează în galben; dacă fermentarea a avut loc cu producţie de gaz se observă cîteva bule sau chiar o cantitate mai mare de bule de gaz care detaşează mediul de fundul eprubetei; glucoză —: mediul nemodificat în porţiunea dreaptă.

Fermentarea lactozei+: suprafaţa înclinată virează culoarea în galben: lactoză —: suprafaţa înclinată nu modifică culoarea.

Producţie H_2S: + mediul se înnegreşte în zona de trecere între porţiunea dreaptă şi cea înclinată.

TEHNICA PREGĂTIRII UNOR SOLUŢII NECESARE PENTRU MEDII DE CULTURĂ ŞI TESTE BIOCHIMICE

Soluţii tampon

Tampon borat pentru pH = 8,4—8,5:

— acid boric	3,092 g
— tetraborat de sodiu	4,768 g
— clorură de sodiu	2,192 g
— apă distilată	500 ml

Se dizolvă prin agitare.

Tampon veronal (L i n s e r t, 1970):

Soluţie de bază:

— veronal sodic	10,3 g
— apă distilată	ad 500 ml
— acid clorhidric n/10	

Se amestecă acidul clorhidric cu soluţia de veronal în proporţii diferite în funcţie de pH-ul necesar (tabelul 33).

TABELUL 33

Soluţii tampon

Soluţie de veronal sodic	Acid clorhidric n/10	pH la 25°C
9,85	0,15	9,6
9,74	0,26	9,4
9,52	0,48	9,2
9,36	0,64	9,0
9,08	0,92	8,8
8,71	1,29	8,6
8,23	1,77	8,4
7,69	2,31	8,2
7,16	2,84	8,0
6,62	3,38	7,8
6,15	3,85	7,6
5,81	4,19	7,4
5,54	4,46	7,2
5,36	4,64	7,0
5,22	4,78	6,8

Tampon fosfat (după L i n s e r t, 1970):

Soluţiile de bază:

— KH_2PO_4 . . . . . 9,078 g
— apă distilată . . . . . 1 000 ml
— $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ . . . . . 11,876 g
— apă distilată . . . . . ad 1 000 ml

Se amestecă cele două soluţii în proporţii diferite în funcţie de pH-ul dorit (vezi tabelul 34).

Soluţii fiziologice

Soluţie cloruro-sodică izotonică

— clorură de sodiu . . . 8,5 g
— apă distilată . . . . . pînă la 1 000 ml

B.C.M. „N. GHEORGHIU-DEJ" IAȘI

TABELUL 34

Proporțiile de Na_2HPO_4 și KH_2PO_4 pentru obținerea diferitelor valori de pH

Na_2HPO_4 în ml	KH_2PO_4 până la 100 ml	pH la 20°C
12,1	„	6,0
18,4	„	6,2
26,4	„	6,4
37,2	„	6,6
49,2	„	6,8
61,2	„	7,0
72,6	„	7,2
81,8	„	7,4
88,5	„	7,6
93,6	„	7,8
96,9	„	8

Soluții anticoagulante

1. Citrat de sodiu: se folosește citrat trisodic sau neutru (conținînd 11 molecule de apă). Se folosește obișnuit soluție 3,8% în volum de 0,1 ml pentru 1 ml sînge.

Pentru prepararea mediilor de cultură se folosește în general sînge defibrinat (recoltat în baloane cu perle de sticlă).

DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII GERMENILOR FAȚĂ DE SUBSTANȚE CU ACȚIUNE ANTIBACTERIANĂ

DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII GERMENILOR FAȚĂ DE ANTIBIOTICE

Sensibilitatea germenilor față de antibiotice și chimioterapice se stabilește, în mod curent, prin două metode: metoda difuzimetrică și metoda diluțiilor seriate.

Metode difuzimetrice

Metoda difuzometrică se execută pe medii solide şi are la bază proprietatea soluţiilor de antibiotice de a difuza în mediul de cultură pe diferite distanţe de la locul în care sînt depuse.

Materiale necesare: plăci Petri, mediul de cultură, cultura bacteriană şi truse de microcomprimate cu antibiotice.

Ca medii de cultură se pot folosi: geloză nutritivă, geloză cu ser (pentru speciile bacteriene serofile), alte medii speciale (pentru bacilul tuberculozei, *Brucella*).

Cultura bacteriană: se utilizează culturi în mediu lichid de 24 de ore din tulpinile a căror sensibilitate trebuie examinată. Pentru titrarea antibioticelor este nevoie de anumite tulpini standard cu circulaţie internaţională. Astfel sînt tulpina de stafilococ auriu Oxford şi tulpina de *Bacillus subtilis Marburg*, tulpina de colibacil Brx.

Tehnica de lucru (pentru bacteriile aerobe): agarul topit se toarnă în plăci Petri şi se lasă să se răcească. Din cultura de examinat se însămînţează în placă astfel ca să se obţină numeroase colonii separate de germeni, răspîndite uniform pe toată suprafaţa mediului. Cînd coloniile sînt confluente rezultatul antibiogramei va fi nesigur, zonele de inhibiţie fiind mai mici. În acest scop, însămînţarea se face cu concentraţii diferite de germeni în funcţie de specia cu care se lucrează şi densitatea culturii. De exemplu, în cazul streptococului se va utiliza cultura în bulion diluat 1/10—1/100, pentru stafilococ diluţie 1/1 000—1/10 000, iar pentru enterobacteriacee o diluţie 1/10 000—1/100 000. Pe suprafaţa plăcii se depun 0,5 ml din cultura diluată, se înclină placa în diverse sensuri, pentru a obţine un strat uniform de cultură, iar excesul se îndepărtează prin aspiraţie cu pipeta, ţinînd placa înclinată.

Microcomprimatele se iau cu o pensă (de preferinţă o pensă dentară) din flacoanele trusei, în prealabil sterilizată prin flambare şi se pun pe suprafaţa mediului însămînţat, cîte 4—8 microcomprimate pe suprafaţa agarului în plăci Petri.

Plăcile se incubează timp de 20—24 ore, la termostat la 37°C, interval la care se interpretează rezultatele pentru majoritatea speciilor bacteriene.

După B a l ş (1964) sensibilitatea unei tulpini se stabileşte în raport cu raza zonei de inhibiţie (distanţa între marginea microcomprimatului şi marginea zonei de inhibiţie) şi nu cu diametrul zonei de inhibiţie (incluzînd microcomprimatul în antibiotic), cum fac majoritatea cercetătorilor. Interpretarea se face astfel:

— germen sensibil — raza zonei de inhibiţie peste 6 mm;

— germen puţin sensibil — raza zonei de inhibiţie 2—5 mm;

— germen rezistent — raza zonei de inhibiţie 1 mm, sau zona de inhibiţie absentă.

În cazul lipsei microcomprimatelor, ele pot fi substituite cu rondele de hîrtie de filtru îmbibate cu soluţii de antibiotice, sau prin aplicarea antibioticelor sub formă de soluţii sau pulberi, fie în cilindri de sticlă (confecţionate din fragmente de ţeavă), fie în cupe (godeuri) excavate în agar.

Dacă se folosesc rondele de hîrtie de filtru, acestea se îmbibă cu soluţia de antibiotic în diluţiile dorite. C o n d r e a şi col. (1957) recomandă pentru antibiogramele curente următoarele diluţii (variabile de la un antibiotic la altul): penicilină 20 U.I./ml, streptomicină 250 μg/ml, aureomicină 250μ g/ml, teramicină 250 μ g/ml, cloromicetină 250 μ g/ml, eritromicină 250μ g/ml.

Tehnica microcomprimatelor pentru speciile bacteriene anaerobe (după B i t t n e r şi K l e i n): microcomprimatele se aşază pe fundul capacului plăcii Petri. Germenul

de examinat se însămînţează în geloză VF topită şi răcită la 45°C în proporţie de 0,5 ml cultură în mediu lichid pentru 50 ml geloză. Germenii însămînţaţi se omogenizează în masa mediului. Cu o pipetă Pasteur se pun cîte 1—2 picături din geloza însămînţată peste fiecare din microcomprimate, în vederea fixării lor pe suprafaţa sticlei. Apoi se toarnă restul mediului însămînţat în capacul plăcii. Deasupra mediului se aplică fundul plăcii Petri.

Incubarea se face în atmosferă normală la 37°C. Interpretarea rezultatelor nu diferă de metoda microcomprimatelor folosită pentru speciile aerobe.

Tehnica benzilor de hîrtie de filtru. Se foloseşte în mod curent, pentru a examina sensibilitatea comparativă a mai multor tulpini bacteriene faţă de un singur antibiotic.

Se taie benzi de hîrtie de fitru, avînd lăţimea de 3—5 mm şi lungimea diametrului plăcilor Petri şi se îmbibă cu antibiotic în acelaşi mod ca şi rondelele. Agarul turnat în placă şi răcit se însămînţează cu acul de platină, nu în gazon, ca în tehnica precedentă, ci în linii drepte, paralele, fiecare tulpină pe una sau două linii.

Apoi se aplică banda îmbibată, la mijlócul plăcii perpendicular pe liniile de însămînţare. După o incubare de 20—24 ore la 37°C se citesc rezultatele. Zonele de inhibiţie, în dreptul benzii de hîrtie, vor varia în raport cu sensibilitatea germenilor.

Metoda diluţiilor seriate

Metoda diluţiilor, iniţiată de F l e m i n g, se execută în medii lichide.

Materiale necesare: tuburi sterile, bulion, pipete gradate, soluţie de antibiotic (preparată ca pentru metoda difuzimetrică), cultură în bulion de 20—24 ore din tulpina de cercetat.

Tehnica de lucru: se repartizează în tuburi sterile 4,5 ml bulion sau bulion ser (pentru speciile bacteriene serofile).

— Se fac diluţii succesive de antibiotic în bulion în aşa fel încît să se obţină în fiecare tub o concentraţie precisă de antibiotic pe ml. Iniţial, diluţiile se fac din 10 în 10, urmînd ca, în cazul cînd este necesară o determinare mai precisă, să se repete experienţa cu diluţii mai apropiate. Penicilina se diluează, de obicei, în aşa fel încît să se obţină următoarele concentraţii de antibiotic pe ml: 100 U.I., 10 U.I., 1 U.I., 0,1 U.I., 0,01 U.I. şi 0,001 U.I. Streptomicina şi aureomicina se diluează astfel ca să existe la 1 ml mediu următoarele cantităţi: 100 μg, 10 μg, 1 μg, 0,1 μg, 0,01 μg şi 0,001 μg.

În fiecare diluţie şi în tubul-martor (fără antibiotic) se însămînţează o cantitate constantă din cultura în bulion de 24 de ore din tulpina de cercetat (în mod curent se pun în fiecare tub 1—2 picături din diluţia 1/1000). Se incubează tuburile însămînţate timp de 20—24 ore la 37°C.

Interpretarea rezultatelor se face în raport cu dezvoltarea sau nedezvoltarea germenilor în mediu. Tubul-martor fără antibiotic trebuie să conţină o cultură corespunzătoare tipului cultural al speciei.

În primele tuburi ale seriei în care cantitatea de antibiotic este mare, mediul, în cazul cînd germenul este sensibil, rămîne nemodificat. În tuburile următoare, cultura este slab dezvoltată, iar în ultimele, cultura va fi tot aşa de bogată şi de acelaşi aspect ca şi în tubul-martor.

Sensibilitatea tulpinii sau titrul bacteriostatic al antibioticului va fi indicat de cantitatea minimă de antibiotic, care a fost capabilă să producă o inhibare totală a dezvoltării.

Martorii obligatori în stabilirea antibiogramei. Indiferent de metoda întrebuinţată, orice determinare necesită

martori. Astfel, pentru determinarea sensibilității unei tulpini față de unul sau mai multe antibiotice, este nevoie de o tulpină-martor cu o sensibilitate cunoscută. De asemenea, pentru titrarea unui antibiotic pe o tulpină standard este nevoie de un antibiotic etalon cu valoare bacteriostatică cunoscută față de tulpina respectivă.

TESTAREA SENSIBILITĂȚII BACTERIILOR FAȚĂ DE SULFAMIDE

Pentru sulfamide se folosesc medii fără peptonă, aceasta avînd o acțiune antisulfamidică. Un mediu convenabil este următorul:

— macerat de carne	1 000 ml
— fosfat disodic	2 g
— clorură de sodiu	3 g
— glucoză	1 g
— geloză	15 g

pH—7,4.

Plăcile se însămînțează cu culturi diluate ca și în cazul antibiogramei și se depun microcomprimate cu sulfamide. Prin această metodă nu se urmărește să se stabilească diferențe între activitatea diferitelor sulfamide, ci numai dacă bacteria este sulfamido-sensibilă sau rezistentă.

METODE DE APRECIERE A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A SUBSTANȚELOR ANTISEPTICE ȘI DEZINFECTANTE ȘI A TOXICITĂȚII ACESTOR SUBSTANȚE PENTRU ȚESUTURI

Pentru evaluarea eficacității substanțelor chimice folosite ca antiseptice sau dezinfectante s-au imaginat diferite metode cum sînt: metoda determinării indicelui fenolic, metoda cu hîrtie de filtru uscată, metoda plăcilor cu agar, metoda plăcilor cu agar cu ser, metoda cupelor în agar.

Deoarece unele substanţe chimice se folosesc ca dezinfectante ale pielii, plăgilor operatorii etc., a reieşit necesitatea de a se determina şi toxicitatea acestora faţă de ţesuturi în raport cu eficacitatea lor faţă de microorganisme ceea ce se realizează prin stabilirea indicelui de toxicitate metoda introdusă de Solle şi col. (citat de Merchant, 1970).

Metoda determinării coeficientului sau indicelui fenolic

Coeficientul fenolic poate fi definit ca raportul între activitatea bactericidă a unei substanţe antiseptice date şi activitatea bactericidă a fenolului. Rideal şi Walker au fost primii care în 1903 au folosit fenolul ca substanţă etalon faţă de care au comparat activitatea altor dezinfectante în condiţii standardizate. Cel mai important factor în astfel de determinări îl constituie condiţiile uniforme în care se face testarea şi care sînt următoarele (după Merchant, 1970):

— Microorganismul test — *Staphylococcus aureus* sau *Salmonella typhosa* (tulpina Hopkins), în cultură de 24 ore, cu o rezistenţă la fenol 1:90, se adaugă la diluţii seriate de dezinfectant în volum de 0,5 ml pentru 5 ml.

— Mediul de cultură: extract Liebig din carne de vacă — 5 g; clorură de sodiu chimic pură 5 g; peptonă 10 g; apă distilată 1000 ml; pH—6,8; se repartizează în tuburi în volum de 10 ml.

— Fenolul, care trebuie să îndeplinească exigenţele farmacopeei (să nu aibă punctul de solidificare sub 40°C), se foloseşte în diluţie 5%.

— Testarea se face la 20°C.

— Intervalele de testare: 5, 10, 15 minute.

— Cantitatea de antiseptic transferată: conţinutul ansei cu diametrul de 4 mm.

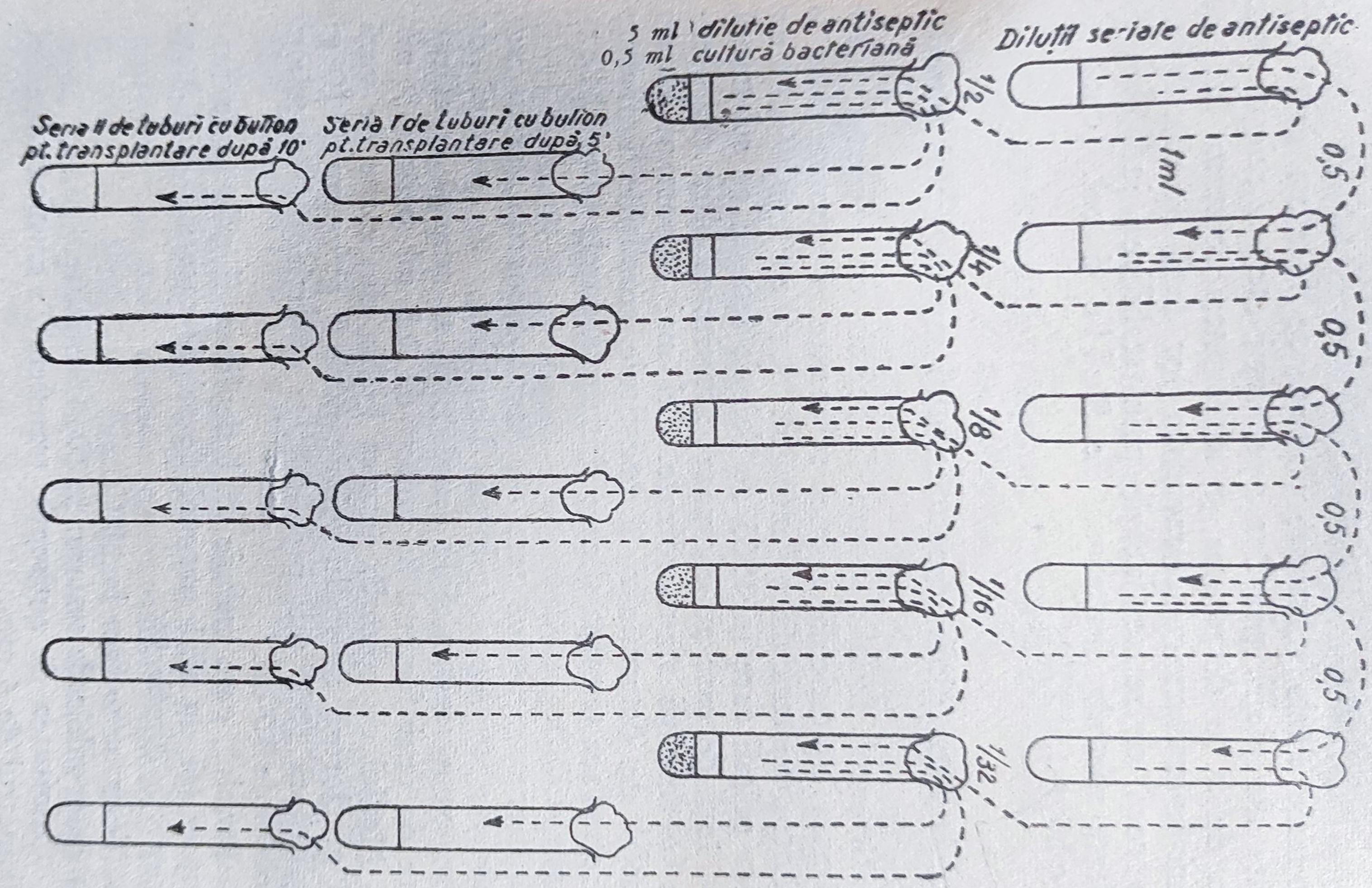


Fig. 13 — Schema determinării indicelui fenolic

Tehnica: în tuburi cu cantităţi măsurate de medii de cultură se fac diluţii seriate din antisepticul de cercetat în paralel cu diluţii de fenol. Se adaugă în fiecare tub cultura bacteriană (0,5 ml cultură la 5 ml mediu). După 5 minute de contact se fac transplantări din fiecare tub pentru a controla viabilitatea bacteriilor. La fel se procedează şi după 10, 15 minute de contact.

Toate tuburile în care s-a făcut transplantarea se incubează la 37°C. După 24 ore se notează diluţia maximă de fenol şi diluţia maximă de substanţă examinată care au omorît germenii în 10 minute, dar nu în 5 minute.

Se împarte diluţia activă a substanţei examinate la diluţia activă de fenol. Valoarea aflată reprezintă coeficientul (indicele) fenolic, care exprimă de cîte ori substanţa respectivă este mai activă (în cazul valorilor peste 1) sau mai puţin activă (sub 1), decît fenolul.

Determinarea indicelui de toxicitate

Indicele de toxicitate este reprezentat de raportul între diluţia maximă de dezinfectant, capabilă să oprească dezvoltarea culturilor de ţesut embrionar şi diluţia maximă din acelaşi dezinfectant care omoară microorganismul test.

Salle şi col. (citaţi de Merchant, 1970) au propus următoarea tehnică:

— Cultura test de ţesut embrionar se prepară din fragmente de cord de embrion de găină în vîrstă de 9 zile, însămînţate în plasmă de cobai diluată cu trei părţi soluţie Tyrode şi o parte lichid embrionar.

— Se fac diluţii seriate din substanţa dezinfectantă în lichid embrionar şi se introduc în flacoane cu culturi celulare.

— După incubare la 37°C, timp de 48 ore, se controlează dacă celulele s-au multiplicat notîndu-se diluţia maximă care a oprit multiplicarea.

— Se determină paralel diluţia maximă de antiseptic capabilă să inhibe dezvoltarea tulpinii test de *Staphylococcus aureus*.

— Indicele de toxicitate al substanţei dezinfectante examinate se calculează împărţind diluţia maximă din substanţa respectivă, care a oprit multiplicarea culturii de ţesut embrionar la diluţia maximă a aceleiaşi substanţe care a oprit dezvoltarea culturii bacteriene.

Un antiseptic este cu atît mai bun cu cît are indicele de toxicitate mai mic şi coeficientul fenolic mai mare.

METODE FOLOSITE ÎN STUDIUL FENOMENELOR DE BACTERIOFAGIE

În studiul fenomenelor de bacteriofagie trebuie să se ia în considerare o serie de principii generale:

— pentru multiplicarea fagilor se folosesc culturi tinere de bacterii în faza de multiplicare logaritmică (culturi de 1—2 ore în mediu lichid obţinute prin transplantare dintr-o cultură de 24 ore pe mediu solid);

— mediile de cultură să fie potrivite ca pH şi conţinut nutritiv faţă de cerinţele nutritive specifice culturilor indicatoare şi fagilor respectivi;

— să se respecte particularităţile biologice şi de rezistenţă a fagilor în studiu, faţă de agenţi fizici şi chimici.

Sursele de izolare a bacteriofagilor sînt reprezentate de diverse materiale bogate în bacterii ca apa de canal, sol, materii fecale cît şi de bacterii lizogene.

Izolarea bacteriofagilor prin metoda directă

a) Din materiale ca urină, materii fecale, exsudate purulente se introduc cantităţi de aproximativ 1 g materii

fecale, 1 ml urină, 1 ml exsudat în 30 ml bulion. Se incubează 18—24 ore la 37°C. Se filtrează prin hîrtie de filtru sau se centrifughează la 2000—3000 ture/minut pentru îndepărtarea particulelor mari. Pentru îndepărtarea sau inactivarea bacteriilor din lichidul obținut se pot folosi următoarele procedee:

— filtrarea prin filtre Seitz, EK sau de sticlă;

— tratarea cu cloroform (0,5 ml cloroform la 10—20 ml), urmată de agitarea energică, după care se lasă să se limpezească cîteva ore la temperatura camerei sau peste noapte la frigider; apoi se decantează;

— inactivarea prin încălzire 30—60 minute la 59—60°C; această metodă se poate aplica numai în cazul acelor sisteme fagobacteriene în care fagii sînt mai rezistenți decît bacteriile gazdă.

b) Din apă: se amestecă 30 ml bulion cu un volum egal de apă de cercetat, se incubează 18—24 ore la 37°C, apoi se îndepărtează sau se inactivează bacteriile după metodele amintite mai sus.

c) Din bacterii lizogene: se cultivă în bulion tulpina prezumptiv lizogenă. După incubare 24 ore la 37°C sau 4—5 ore la 37°C și păstrare peste noapte la frigider se încearcă separarea fagului.

Izolarea prin metoda multiplicării. Se folosește în cazul produselor care conțin cantități foarte mici de fag și nu pot fi puse în evidență prin metode directe. Metoda constă în adăugarea la bulionul însămînțat cu produsul de cercetat, a cîtorva picături de cultură tînără în bulion, a unei tulpini lizosensibile indicatoare. Multiplicarea poate fi monovalentă (cu o singură tulpină) sau polivalentă (amestec de mai multe tulpini sensibile). Operația poate fi unică sau repetată.

Metode de punere în evidență a bacteriofagilor. În produsele obținute prin metodele amintite mai sus, se cercetează prezența fagului examinînd activitatea prepa-

ratelor respective față de o tulpină sensibilă (cultură tînără de 1—2—3 ore în mediu lichid) prin diferite procedee.

1. Se însămînțează tulpina bacteriană pe suprafața agarului (1,5—2%, pH—7) în plăci Petri, prin răspîndirea culturii în strat uniform și îndepărtarea excesului cu ajutorul unei pipete Pasteur. Se lasă placa întredeschisă la termostat sau în apropierea becului de gaz (15—30 minute) pînă agarul absoarbe cultura.

Înainte de însămînțare se delimitează pe fundul plăcii cu creion dermatograf sau cerneală de scris pe sticlă, pătrate notîndu-se în fiecare simbolul (număr, literă etc.) preparatelor ce se vor examina pentru prezența fagului.

După uscarea suprafeței însămînțate cu cultura bacteriană sensibilă, se depun picăturile cu ajutorul unei anse fine din preparatele de examinat în pătratele corespunzătoare. Plăcile se lasă la temperatura camerei pînă cînd picăturile sînt absorbite. Se incubează la termostat cu capacul în jos.

Temperatura de incubare ca și durata sînt variabile în raport cu particularitățile de creștere a speciei microbiene de cercetat. Obișnuit, se incubează la 37°C timp de 20—24 ore. În cazul prezenței fagului, apar zone de liză în dreptul picăturilor depuse.

2. Însămînțarea în dublu strat (descrisă pentru prima oară de G r a t i a, 1936): se toarnă agar 2% topit și răcit la 45°C în plăci Petri și se lasă să se solidifice. Paralel, se pregătesc tuburi cu cîte 1—2 ml agar (0,7%) topit și răcit la 46°, care se însămînțează cu cîteva picături din cultura sensibilă și se mențin în baie de apă la 46°C.

În tuburile astfel însămînțate se adaugă cîteva picături din preparatul în care se presupune existența fagului și conținutul fiecărui tub se toarnă în plăci pregătite în prealabil cu agar 2%. Se incubează la 37°C timp de 24 ore. În cazul prezenței fagului, în plăci vor apare zone de liză, izolate, numite plăji.

Pentru a izola bacteriofagul în cultură pură din aceste plăji se poate face transplantarea atingînd cu ansa sterilă centrul unei plaje și introducînd-o într-o cultură tînără din aceeași tulpină bacteriană care s-a folosit inițial. Se incubează 24 ore la 37°C, apoi se procedează la separarea fagului printr-una din metodele amintite (filtrare, cloroformare, termoinactivare).

Titrarea bacteriofagilor. Se fac diluții seriate de bacteriofag în apă fiziologică sau bulion și apoi se folosește unul din procedeele următoare:

1. Se delimitează în prealabil patrate (numărul lor fiind egal cu numărul diluțiilor de fag efectuate) pe fundul plăcii în care s-a turnat și solidificat în prealabil un strat de agar. Se însămînțează agarul din placa Petri prin răspîndirea culturii sensibile pe suprafața mediului și îndepărtarea excesului. După uscarea culturii, se depune cîte o picătură din diluțiile de fag în ariile delimitate. Se incubează, se notează diluția maximă activă de fag.

2. Metoda dublului strat de agar. Se procedează la fel ca și în cazul izolării fagului (vezi pag. 310). De data aceasta se pregătesc atîtea plăci cu agar 2% cîte diluții de fag s-au efectuat. Paralel, se distribuie în tuburi mici (numărul tuburilor egal cu numărul diluțiilor) cîte 0,5 ml din diluții de fag la care se adaugă cîte 0,5 ml cultură tînără în bulion din tulpina sensibilă și 1 ml agar topit și răcit. Se omogenizează și se toarnă conținutul fiecărui tub în cîte o placă cu agar 2% pregătită în prealabil.

După o incubare de 24 ore la 37°C, se notează numărul plăjilor din fiecare placă, se înmulțește cu diluția, exprimîndu-se astfel titrul prin numărul de PFU (plaque forming units = unități formatoare de plaje) pe ml.

Obținerea preparatelor fagice cu titru ridicat. Se pot folosi diferite metode. A d a m s (1959) recomandă urmă-

toarele metode care dau rezultate bune la obținerea fagilor coli cu titru ridicat:

1. Pe plăci cu agar se întinde cu spatula Drigalsky amestec din cultură concentrată în bulion de *E. coli* și cantitate suficientă de fag pentru a obține o liză confluentă (10^5—10^6 virioni). După incubare timp de 12—18 ore, în fiecare placă se adaugă 3 ml bulion și se lasă 15—20 minute. Apoi bulionul se decantează și se centrifughează.

În supernatantul obținut există pînă la 10^{11}—10^{12} particule de fag.

2. În același scop se pot folosi plăci pregătite prin metoda dublului strat de agar. Se pregătesc 4 plăci conținînd cultura bacteriană cu 10^5 particule de fag în fiecare și se incubează 24 ore la 37°C. Apoi în fiecare placă se adaugă cîte 5 ml bulion; se desprinde stratul de agar moale cu ajutorul unei baghete de sticlă și materialul din cele 4 plăci se recoltează într-un flacon cu 20 ml bulion. După 30 minute de extracție prin agitații periodice, se îndepărtează fragmentele de agar și resturile de bacterii prin centrifugare la turații mici. Se obțin astfel 15 ml cultură de fag coli T_5 care conține într-un ml pînă la 8×10^{10} particule.

Tehnica testului fagic. Pe baza sensibilității diferite a bacteriilor față de bacteriofagi este posibilă diferențierea unor specii prin testul fagic (de ex.: *B. anthracis* de *B. cereus*, *Brucella abortus* de celelalte specii de *Brucella*). În acest scop se însămînțează bacteria de identificat pe agar în plăci (prin spălarea suprafeței cu 1—2 ml dintr-o cultură în mediu lichid de 24 ore). După uscarea mediului, se depun picături de bacteriofag în sectoarele prestabilite și notate pe fundul plăcii. După 24 ore de incubație se trag concluzii pe baza prezenței sau absenței zonelor de liză în sectoarele fagilor specifici (de ex.: fagii speci-

fici pentru *B. anthracis* produc zone de liză numai la această specie, nu și la *B. cereus*).

Tehnica lizotipiei. O altă aplicație practică a fenomenului de bacteriofagie este tipizarea fagică, care a fost posibilă datorită comportării deosebite față de diferiți bacteriofagi a unor tulpini aparținînd aceleiași specii bacteriene, creindu-se astfel tipuri bacteriofagice printre tulpini care biochimic și serologic se prezintă întrutotul identic.

Determinarea tipului fagic (lizotipia) a devenit o metodă de investigație folosită în special în epidemiologie, pentru stabilirea sursei de infecție și a filiației cazurilor.

Lizotipia poate fi efectuată numai de către laboratoare care posedă colecții (seturi) de fagi necesare schemelor de tipizare devenite aproape clasice pentru anumite bacterii (stafilococi, salmonele etc.).

Se procedează astfel:

— Se desenează cu cerneală sau creion dermatograf pătrate pe fundul unei plăci sterile. Numărul pătratelor va corespunde cu numărul fagilor din colecție. În placă se toarnă mediul de cultură (mediul variază după specia bacteriană care se tipizează) și, după solidificarea mediului, se însămînțează placa în suprafață cu tulpina bacteriană de examinat.

După uscarea plăcii se depun picături (cu ansa) din preparatele fagice, în diluția test de rutină (DTR) din colecție. DTR reprezintă diluția maximă de fag care lizează complet tulpina indicatoare. După incubare de 24 ore la 37°C, se notează fagii care produc plaje pe gazonul bacterian. Tipul fagic se stabilește după tulpinile de fag active, conform schemelor de lizotipie existente.

Amănunte referitoare la tehnicile folosite în studiul bacteriofagilor se găsesc în lucrarea „Bacteriophages" de A d a m s (1959).

METODE DE PUNERE ÎN EVIDENŢĂ A BACTERIOCINELOR

Detectarea tulpinilor bacteriocinogene

Metoda dublului strat de agar: tulpinile prezumptiv bacteriocinogene se însămînţează prin înţepare în agar, în plăci Petri. Într-o placă se pot însămînţa astfel mai multe tulpini bacteriene. După incubare timp de 48 ore la 37°C, se inactivează culturile cu cloroform (se pun cîteva picături în capacul plăcii, se lasă astfel 15—30 minute la temperatura camerei). Vaporii de cloroform exercită un efect bactericid, fără să altereze bacteriocinele, eventual elaborate şi difuzate în mediu. Apoi tulpina indicatoare (sensibilă) se însămînţează peste cultura primară inactivată, prin acoperirea acesteia cu 4—5 ml agar 1,7%, topit şi răcit la 45°C, la care s-a adăugat 0,1 ml cultură. După incubare 24 ore la 37°C, se observă cultura sensibilă dezvoltată în pînză, iar în dreptul tulpinilor bacteriocinogene zone de inhibiţie.

Însămînţarea în linii încrucişate: Se însămînţează în linie dreaptă în mijlocul suprafeţei unei plăci cu agar, bacteria presupusă a fi bacteriocinogenă şi după 48 ore de incubare la 37°C, se cloroformează pentru a omorî cultura. Apoi se însămînţează tot cu ansa, perpendicular pe prima linie de însămînţare, tulpinile sensibile. La 24 ore de incubare la 37°C se interpretează rezultatele după prezenţa sau absenţa zonei de inhibiţie.

Însămînţarea prin spotare. Se depun picături (spoturi) din culturile presupuse a fi bacteriocinogene în puncte separate spre marginea cutiei Petri. Se incubează 48 ore, se cloroformează şi apoi peste acestea, astfel ca să depăşească marginea culturii iniţiale, se depun picături din cultură în mediu lichid a tulpinii sensibile. Se incubează şi se interpretează rezultatele în funcţie de prezenţa sau absenţa zonei de inhibiţie.

Metoda Kékess (1970): tulpina presupusă a fi bacteriocinogenă se însămînţează pe suprafaţa agarului (în spot sau striuri). După incubare timp de 48 ore se detaşează agarul de pe marginea plăcii cu o spatulă sterilă şi se lasă să cadă în capac cu cultura în jos. Pe suprafaţa opusă culturii se însămînţează tulpina indicatoare (sensibilă).

Pregătirea preparatelor cu bacteriocine

Pentru studiul bacteriocinelor este necesar ca ele să fie obţinute în mediu lichid, cu titru ridicat şi cît mai purificate. În acest scop se pretează medii bogate în acizi aminaţi, avînd pH-7 (Brandis, 1970).

Identificarea bacteriocinelor obţinute se face prin compararea specificităţii acestora faţă de unele tulpini sensibile, cu specificitatea unor bacteriocine standard.

Aplicaţiile bacteriocinelor

Examenul sensibilităţii unor tulpini faţă de mai multe bacteriocine se realizează prin însămînţări în linii perpendiculare, conform tehnicii amintite la pag. 314. Prin această tehnică s-a încercat în ultimii ani, fără a se fi ajuns deocamdată la rezultate concludente, stabilirea unor bacteriocinotipuri.

REACŢIILE SEROLOGICE

Reacţiile serologice sînt reacţii antigen-anticorp utilizate pe scară largă atît în practica diagnosticului unor bacterioze, cît şi în practica identificării unor specii sau serotipuri bacteriene (salmonele, leptospire etc.).

REACŢII DE SEROAGLUTINARE

Prin seroaglutinare se înţelege aglutinarea antigenului sub acţiunea anticorpilor. Elementele necesare reacţiei sînt:

1. Antigenul numit în cazul acestei reacţii aglutinogen, reprezentat printr-o suspensie microbiană (antigen corpuscular).

2. Anticorpii care se găsesc în serul imun; anticorpii aglutinanţi sînt numiţi aglutinine.

3. Electroliţii — reprezentaţi prin ionii de clor şi de sodiu din apa fiziologică în care s-a suspendat antigenul (corpii microbieni). În absenţa electroliţilor, reacţia nu se produce.

Reacţia poate fi executată după mai multe tehnici.

Tehnica aglutinării rapide pe lamă. Suspensia care serveşte ca antigen poate fi pregătită în prealabil în cantităţi mari prin spălarea culturilor pe agar. Se poate prepara însă antigenul şi ad hoc dintr-o cultură pe agar, făcînd o suspensie pe lamă într-o picătură de soluţie cloruro-sodică izotonică. În acest scop se procedează ca la executarea frotiurilor de pe agar, cu deosebire că în cazul de faţă suspensiile trebuie să fie mai dense, lăptoase şi de o omogenitate perfectă.

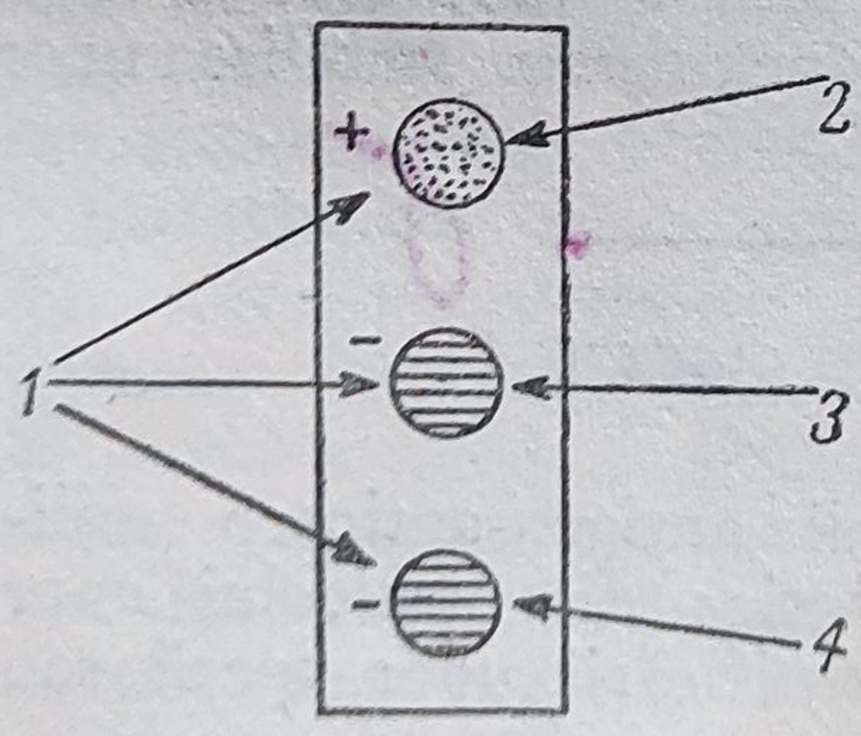


Fig. 14 — Schema reacţiei de aglutinare rapidă pe lamă:
1 — antigen; *2* — ser de examinat *3* — soluţie cloruro-sodică izotonică; *4* — ser normal provenind de la aceeaşi specie animală de la care provine serul de examinat

La suspensia de antigen se adaugă o picătură de ser suspect. În cazul prezenţei anticorpilor în ser se produce aglutinarea corpilor bacterieni şi reacţia este considerată pozitivă. În cazul absenţei anticorpilor din ser, suspensia îşi păstrează omogenitatea şi reacţia este negativă.

Tulpinile care aglutinează prin suspendare în soluţie cloruro-sodică izotonică spontan, numai datorită acţiunii elecroliţilor, nu pot fi folosite pentru prepararea antigenului. Pentru aprecierea reacţiei este, de asemenea, necesar controlul acţiunii serului normal al speciei de la care provine serul de examinat asupra antigenului. Dacă serul normal al unei specii animale conţine aglutinine nespecifice faţă de antigenul de lucru, se trage concluzia că serul speciei animale respective nu se pretează pentru practicarea diagnosticului serologic. Pentru confirmarea reacţiei pozitive se poate recurge şi la o reacţie cu un ser cunoscut pozitiv.

Suspensiile de antigen la care se adaugă soluţie cloruro-sodică izotonică, ser normal şi ser cunoscut pozitiv constituie martorii reacţiei.

În ceea ce priveşte aspectul particulelor aglutinate se pot deosebi două tipuri de aglutinare: un tip granular, cînd particulele sînt mici, şi un tip floconos, cînd particulele sînt mai mari, avînd aspect de flocoane. Tipul granular este, de regulă, caracteristic pentru reacţiile ce se petrec între antigenii şi anticorpii somatici (O), iar tipul floconos pentru cei flagelari (H).

Reacţia de aglutinare cu sînge integral (hemaglutinare). Este o variantă a reacţiei de seroaglutinare rapidă pe lamă şi diferă de aceasta prin folosirea sîngelui integral în locul serului. Această reacţie se utilizează îndeosebi pentru diagnosticul salmonelozelor aviare. Se pune pe lamă o picătură de antigen *pullorum-gallinarum* cu anticoagulant, la care se adaugă o picătură de sînge, recoltată în

urma secţionării unuia din zimţii crestei. Interpretarea reacţiei nu diferă de seroaglutinarea rapidă pe lamă. Această tehnică prezintă avantajul posibilităţii unui diagnostic rapid la un efectiv mare de păsări.

În afara diagnosticului salmonelozelor aviare, reacţia de hemoaglutinare rapidă se poate folosi şi în diagnosticul tuberculozei aviare, după cum şi pentru diagnosticul infecţiilor brucelice. În acest scop ea se execută într-un mod asemănător, folosindu-se însă un antigen brucelic colorat cu trifeniltetrazolium citratat. Metoda constă în amestecarea unei picături de sînge cu una de antigen. Reacţia se produce în 3—5 minute. Pentru această reacţie este necesară o temperatură de 18—20°C.

Tehnica aglutinării lente în tuburi (R.A.L.). Aglutinarea rapidă permite decelarea calitativă a anticorpilor într-un ser suspect, dar nu şi aprecieri cantitative.

Pentru a obţine date precise cu privire la prezenţa aglutininelor într-un ser şi la cantitatea (titrul) acestora în serul respectiv se recurge la tehnica aglutinării lente în tuburi.

Principial, aglutinarea lentă constă în punerea în contact în tuburi de reacţie a antigenului cu diluţii crescînde de ser.

Reacţia se citeşte, de obicei, după 24 de ore, în care timp tuburile sînt ţinute la termostat sau într-o baie de apă la temperatura de 37°C.

Citirea reacţiei se face prin compararea tuburilor din serie cu tubul-martor în care există numai antigen.

Criteriile pe baza cărora se face interpretarea reacţiei sînt:

— gradul de clarificare sau de turbiditate a lichidului supernatant;

— aspectul depozitului.

În funcţie de aceste două elemente, tuburile se notează astfel:

++++=supernatant: clarificare totală — depozit mare, umbreliform, ocupă tot fundul tubului, întinzîndu-se şi pe pereţi, are marginile franjurate;

+++=supernatant: turbiditate uşoară — depozit asemănător cu cazul de mai sus; eventual ceva mai mic;

++=supernatant: turbiditate potrivită — depozit tot umbreliform şi cu marginile franjurate, dar mai mic;

+=supernatant: turbiditate mai intensă, aproape ca în tubul-martor, depozit umbreliform mic;

—= supernatant: turbiditate identică cu a tubului-martor, — depozit inexistent sau mic, lenticular, în punctul cel mai decliv al tubului.

Aglutinarea notată cu ++++ presupune aglutinarea totală a antigenului, reacţia notată cu +++, o aglutinare a peste 50% din antigen, cea notată cu ++, aglutinarea a aproximativ 50% din antigen, în tuburile notate cu minus nu există aglutinare (aspect identic cu al tubului-martor).

Concentraţia minimă de anticorpi (exprimată în diluţia maximă) reprezintă titrul aglutinant al serului respectiv, acesta constituind în practica de laborator curentă modul concret de apreciere cantitativă a aglutininelor.

Unele seruri, în concentraţii mari, pot avea o acţiune aglutinantă nespecifică, datorită unor proteine serice. În acest caz, în interpretarea reacţiei nu se iau în considerare primele tuburi, în care serul este încă în concentraţie mare; pentru a trage concluzii asupra diagnosticului, este necesar, ca aglutinarea să depăşească o diluţie limită prevăzută în protocol.

Un alt fenomen nespecific, care poate crea dificultăţi în interpretarea reacţiei de aglutinare lentă, îl constituie acţiunea inhibantă asupra aglutinării a unor proteine serice. Această acţiune inhibantă se manifestă tot în tuburile cu concentraţii mari de ser. Această particularitate întîlnită uneori la reacţiile de aglutinare lentă poartă numele

de fenomen de zonă și prezintă, de asemenea, importanță în interpretarea rezultatelor reacției.

Reacția de aglutinare lentă se aplică în diagnosticul salmonelozelor, al brucelozei, morvei, tularemiei, colibacilozei etc.

În privința detaliilor de tehnică există deosebiri de la o specie microbiană la alta în modul de pregătire a antigenului și de executarea diluțiilor. În funcție de aceste detalii, reacția de aglutinare poartă numele diferiților autori, care au introdus-o ca metodă de diagnostic la diverse specii microbiene. Astfel, tehnica folosită în diagnosticul febrei tifoide umane este cunoscută sub numele de reacție Widal, iar cea practicată în bruceloză — reacția Wright.

Redăm mai jos protocolul reacției Wright, așa cum se execută la nivelul laboratoarelor județene veterinare.

Antigenul brucelic se diluează 1/40 în soluție clorurosodică izotonică (8,5‰ ClNa) perfect neutră. Pentru evitarea infectării în cursul reacției se adaugă la antigenul astfel diluat 3—5% fenol. Pentru executarea reacției se fac diluții de ser: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 etc. (în cercetări de laborator, diluția maximă la care se merge este de 1/1600 pentru serurile de porcine și 1/10 000 pentru serurile de taurine). Pentru pregătirea diluțiilor se procedează după cum urmează: în tuburi de reacție Wassermann se repartizează în primul tub 3,6 ml antigen diluat, în al doilea 1 ml, în al treilea 1,5 ml și în restul cîte 1 ml. Se pune apoi în primul tub 0,15 ml ser de studiat, se omogenizează prin pipetare. Din acest tub se pune 1 ml în al doilea tub și 0,5 ml în al treilea tub. După aceasta se pasează cîte 1 ml din tubul 3 în tubul 4, apoi din tubul 4 în tubul 5 și așa mai departe. În acest fel obținem diluțiile 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 ... etc. Se pune stativul la termostat la 37°C și se lasă 24 ore. După aceasta se face interpretarea.

Reacţia inelară. Este o tehnică prin care se pun în evidenţă anticorpii aglutinanţi, care se elimină prin lapte. Ea se utilizează pentru diagnosticul infecţiilor brucelice. Se repartizează în tuburi Wassermann cîte 2 ml din probele de lapte de examinat. Nu se poate folosi decît lapte proaspăt, nefiert. La fiecare probă de lapte se adaugă cîte 2—3 picături din antigenul colorat cu hematoxilină sau clorură de trifenil tetrazolium. Reacţa se produce într-un interval de 30—120 minute la 37°C sau la temperatura camerei. Citirea reacţiei se face în momentul formării inelului de grăsime la suprafaţă. În cazul reacţiei pozitive se constituie la suprafaţa laptelui un inel colorat, rezultat din antrenarea la suprafaţă de către grăsimea din lapte a antigenului aglutinat. În cazul reacţiei negative, laptele rămîne colorat uniform, iar inelul de smîntînă de la suprafaţă este alb. Notarea intensităţii reacţiei se face în felul următor (conform recomandărilor O.M.S.):

+++ = inel bine colorat, coloană de lapte albă;
++ = inel bine colorat, coloană de lapte slab colorată;
+ = inel bine colorat, coloană de lapte bine colorată;
± = inel mai puţin colorat sau de culoare identică cu coloana de lapte;
— = inel alb sau slab colorat, coloana de lapte colorată.

Reacţia de aglutinare-liză. Este o reacţie folosită pentru diagnosticul leptospirozelor şi stabilirea tipurilor de leptospire. Se execută astfel: pe lame bine degresate se pune cîte o picătură din serurile antileptospirice cu specificitate de serotip, existente în laborator şi eventual diluate, la care se adaugă cîte o picătură din cultura de leptospire care trebuie identificată; se omogenizează şi se lasă lama acoperită cu o placă Petri timp de 10—15 minute la temperatura camerei, după care se examinează la microscop în cîmp întunecat.

În cazul reacţiei pozitive, cînd serul corespunde tulpinii examinate, în picătura respectivă se produce aglutinarea

urmată uneori de liza germenilor. Aglutinarea se manifestă prin constituirea unor gheme mari formate din leptospire, pe marginea cărora se găsesc uneori leptospire libere în mișcare. Cîtva timp după aglutinarea leptospirelor apar fenomenele de liză care se traduc prin imobilizarea germenilor, a căror citoplasmă devine apoi granulară și se lizează. Notarea reacției se face astfel:

L = în cîmpul microscopic se produce liza totală a germenilor
++++ = aglutinare intensă; toate leptospirele sînt prinse în gheme mari, stelate cu aspect de păianjen;
+++ = se observă numeroși păianjeni, dar și leptospire libere;
++ = 6—12 păianjeni pe cîmp microscopic, fiind prezente și numeroase leptospire libere;
+ = numărul de păianjeni este mic: majoritatea leptospirelor sînt libere;
— = toate leptospirele din cîmpul microscopic sînt libere.

REACȚII DE SEROPRECIPITARE

Au ca principiu precipitarea antigenului sub acțiunea anticorpilor. Elementele necesare reacției sînt:

— Antigenul — reprezentat de un extract microbian, o toxină, o suspensie de virus etc. (în general, un antigen molecular).

Pentru prepararea antigenului se pot aplica metode: mecanice (filtrarea), fizice (încălzirea la 100°C sau înghețări și dezghețări succesive) și chimice (prin hidroliză cu acizi — cel mai frecvent fiind folosit acidul clorhidric). Antigenul este numit precipitinogen.

— Anticorpul — prezent într-un ser. Anticorpii precipitanți sînt numiți precipitine și apar mai greu în ser decît aglutininele. În cazul preparării în condiții experimentale a serurilor precipitante este necesar ca antigenul să fie inoculat pe cale intravenoasă. În reacție intervin și electroliții.

Reacţia de seroprecipitare se execută după numeroase tehnici, care diferă îndeosebi prin metoda de preparare a antigenului.

Indiferent de metoda de preparare, antigenul se prezintă sub forma unui lichid limpede. Prepararea precipitinogenului constituie prima operaţie în vederea executării reacţiei.

A doua operaţie o constituie executarea propriu-zisă a reacţiei şi constă în punerea în contact a precipitinogenului cu serul precipitant. În privinţa modului de punere în contact a celor 2 elemente se deosebesc două procedee de bază şi anume precipitarea în mediu lichid şi precipitarea în mediu gelozat semisolid (imunodifuzia). Fiecare din aceste procedee are la rîndul lui mai multe variante tehnice.

Precipitarea în mediu lichid

Această reacţie poate fi executată din punct de vedere calitativ, urmărindu-se numai evidenţierea cuplului antigen-anticorp şi cantitativ, reacţia permiţînd determinarea titrului unuia din elemente, de regulă cel al anticorpilor.

Reacţia calitativă îşi găseşte o aplicaţie frecventă într-una din tehnicile curent folosite în laboratoarele de bacteriologie veterinară pentru diagnosticul antraxului, cunoscută sub denumirea de reacţia Ascoli, după numele autorului care a imaginat-o (A l b e r t o A s c o l i).

Tehnica Ascoli. Antigenul se prepară din organele cadavrelor suspecte de antrax care se taie mărunt cu foarfecele şi se suspendă în soluţie cloruro-sodică izotonică, raportul între volumul de organe şi volumul de soluţie cloruro-sodică izotonică fiind de 1/3. Organele care se preferă pentru prepararea antigenului sînt cele splanhnice, îndeosebi splina. Organele cadavrelor cu antrax sînt totdeauna foarte bogate în bacili, cantitatea acestora fiind apropiată de a suspensiilor care se execută din culturi. Suspensia de

germeni, respectiv broiajul de organe, se supune apoi extracţiei prin căldură, punîndu-se tuburile într-o baie de apă, unde se ţin timp de 10—15 minute la temperatura de 100°C (în apă clocotită). După acest interval, suspensia, respectiv broiajul, se filtrează printr-un filtru de vată de azbest, filtratul fiind limpede, de culoare uşor gălbuie. În cazul cînd filtratul prezintă un grad uşor de turbiditate, filtrarea trebuie repetată. Filtratul astfel obţinut reprezintă precipitinogenul.

Reacţia se execută, repartizînd 1—2 ml antigen într-un tub de reacţie Wassermann şi adăugînd cu o pipetă Pasteur bine efilată o cantitate aproximativ egală de ser precipitant anticărbunos; adăugarea serului se face foarte încet, sprijinind vîrful pipetei pe fundul eprubetei, astfel ca cele două lichide să nu se amestece. În cazul reacţiei pozitive, în 2—3 minute, apare la zona de separare între ser şi antigen un precipitat alb sub forma unui inel sau disc.

În cazul diagnosticului antraxului din piei, extracţia precipitinogenului se face, de regulă, prin macerare. Pieile se taie în fragmente mici, ca şi organele şi se pun la macerat în soluţie cloruro-sodică izotonică, fenolată, timp de 24 ore, după care se filtrează şi se execută reacţia în acelaşi mod. Această tehnică poartă numele de reacţia Ascoli la rece. Reacţia Ascoli nu dă rezultate după sărarea pieilor.

Reacţia cantitativă a fost introdusă în practica titrării serurilor antitoxice de Ramon în 1922, care a folosit termenul de „serofloculare", care s-a păstrat pînă astăzi.

Seroflocularea permite titrarea serurilor antitoxice pe baza relaţiei existente între proporţia dintre cantitatea de anticorpi şi de antigen cu timpul de apariţie al precipitatului şi cu cantitatea de precipitat. Această relaţie este constantă în cazul asigurării anumitor condiţii de mediu şi anume a unui grad de molaritate al clorurii de sodiu de 0,05 M-0,25 pentru serurile de mamifere şi de 1,5 M pen-

tru serurile de păsări, a pH între 6,4 și 8,2 și a unei temperaturi optime de 4°C. Cu toate că timpul de floculare este mai scurt la 30—45°C, la 4°C precipitarea este mai completă, iar reacția cantitativă mai sensibilă.

Principiul reacției dintre raportul Ac/Ag și viteza de floculare constă în aceea, că timpul apariției precipitatului este cu atît mai scurt cu cît raportul Ac/Ag este mai apropiat de valoarea 1. Un exces al unuia dintre elemente duce la lungirea timpului de floculare.

Executarea reacției constă în amestecarea în cantități și diluții diferite a celor două elemente, cronometrarea timpului apariției precipitatului și evaluarea cantității de precipitat.

În cazul cînd interesează o apreciere de mare precizie, se alege tubul cu cantitatea maximă de precipitat și după centrifugare se dozează azotul total din precipitat. Dozînd separat azotul total din antigen și calculînd diferența, se poate avea o evaluare exactă a cantității de anticorpi.

Precipitarea în medii semisolide (gel de agar) sau imunodifuzia

Prima observație privind o precipitare antigen-anticorp într-un mediu semisolid aparține lui Bechhold (1905). Abia Oudin în 1946 și apoi Ouchterlony și Elek în 1948 dau reacției o aplicație practică, demonstrînd că ea permite aprecierea numerică, identificarea și dozajul fracțiunilor antigenice dintr-un complex.

Fenomenul de difuziune în gel depinde de mărimea porilor gelului, după cum și de relația dintre viteza și coeficientul de difuziune, care este următoarea:

$$J = -D \frac{dC}{-dx}, \text{ în care}$$

J = viteza de difuziune;

D = coeficientul;

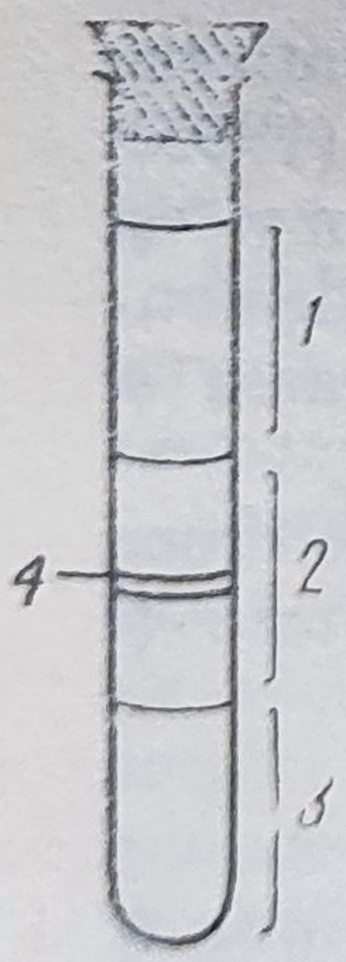
$\frac{dC}{dx}$ = gradul de concentraţie al soluţiei care difuzează la un moment dat.

Coeficientul de difuziune este la rîndul lui în raport de directă proporţionalitate cu temperatura, iar viteza de difuziune cu concentraţia soluţiei care difuzează.

Metodele de imunodifuzie se pot clasifica, pe baza numărului elementelor care difuzează, în metode de difuziune simplă (Oudin) şi dublă (Ouchterlony), iar pe baza direcţiei de difuziune în verticale şi orizontale. Enumerăm 4 metode principale.

Difuziunea verticală simplă (Oudin, 1946). Într-un tub de reacţie se repartizează serul inclus în gel de agar 2%, iar deasupra se repartizează antigenul în stare lichidă. Antigenul difuzează în gelul cu ser, în care vor apare zone de precipitare.

Difuziunea verticală dublă (Oakley şi Fulthorpe, 1953). Modificarea faţă de tehnica lui Oudin constă în interpunerea între serul inclus în geloză 2% şi antigenul lichid a unui strat intermediar de geloză moale 1%, în aşa fel încît difuziunea poate avea loc fie în sus, fie în jos, în funcţie de concentraţia elementelor.



Difuziunea orizontală simplă este teoretic posibilă, dar nu a fost practicată niciodată, datorită consumului mare de ser care ar fi necesar. Serul inclus în gel ar trebui turnat într-o cutie Petri sau pe o lamă de sticlă, iar antigenul lichid depus în godeuri.

Difuziunea orizontală dublă, care poate fi practicată prin 2 tehnici.

Fig. 15 — Schema reacţiei de precipitare în gel de agar, metoda difuziunii verticale duble (după Vidal):
1 — soluţie antigen; *2* — agar 1%; *3* — agar 2% + volum egal de antiser; *4* — linii de precipitare

Tehnica difuziunii duble (după Ouchterlony, 1949) care constă în repartizarea antigenului și a serului în godeuri opuse. Este tehnica cea mai frecvent folosită. Grosimea gelozei se recomandă să fie de 0,5 cm. De regulă, serul se amplasează în godeul central, iar în mai multe godeuri de jur împrejur mai mulți antigeni. Amplasarea poate fi inversă dacă se urmărește reacția unui antigen cu mai multe seruri. Lamele sau plăcile se țin la temperatura camerei, în mediu umed, mai multe zile. Citirea se face de preferință într-o cameră întunecată luminînd reacțiile de jos. Se notează numărul liniilor de precipitare care corespunde unor fracțiuni antigenice cu viteză și coeficiente de difuziune diferite. Tehnica Ouchterlony permite și examinarea unor eventuale înrudiri antigenice pe baza modului în care se unesc sau se întretaie arcurile de precipitare (interpretarea rezultatelor unor astfel de examene este prezentată în fig. 16). După citirea rezultatelor reacțiilor, lamele sau plăcile pot fi supuse spălării, uscării și colorării prin diferite metode, putînd fi păstrate sub această formă un timp nedefinit.

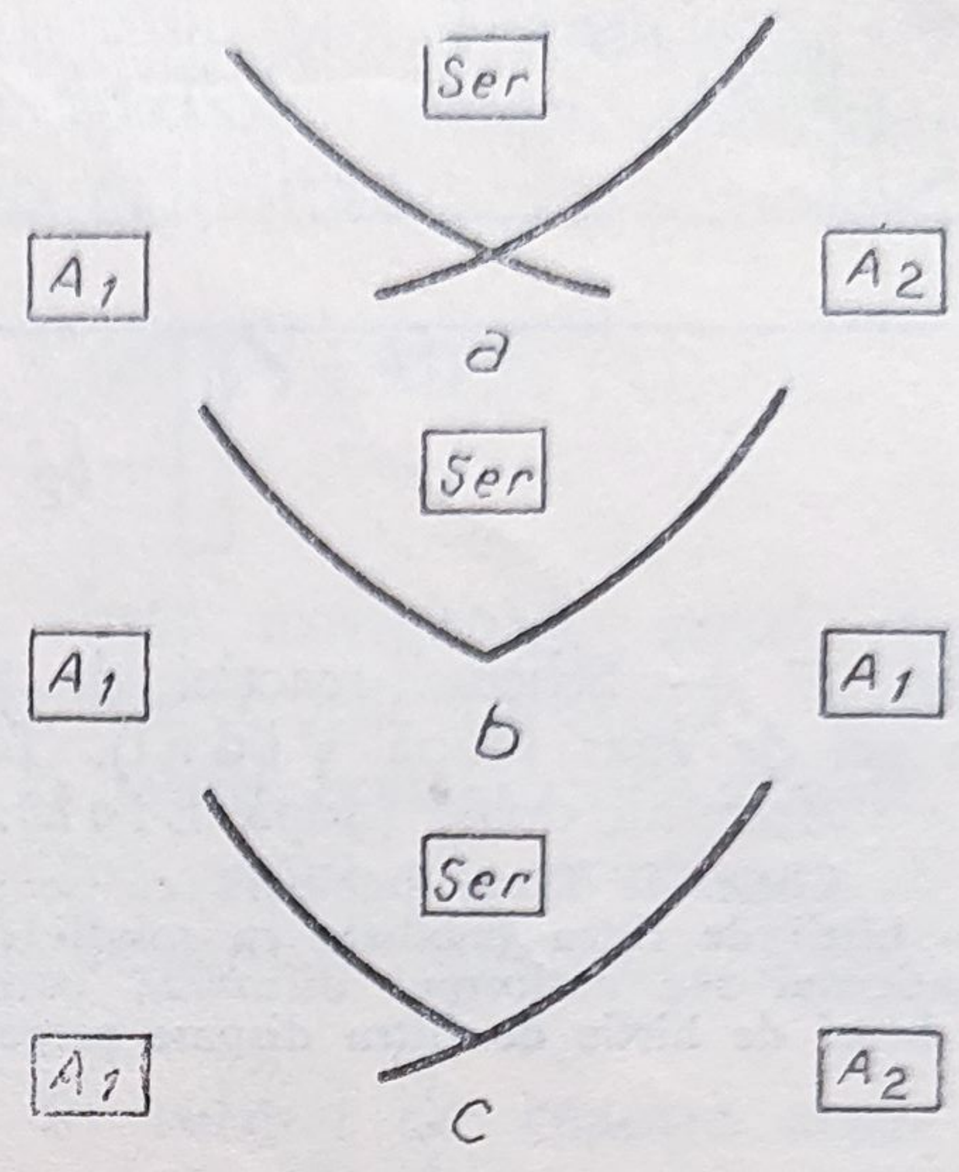


Fig. 16 — Schema reacției de precipitare în gel de agar (după Vidal). Tehnica difuziunii duble (după Ouchterlony):
a — antigenii A_1 și A_2 sînt diferiți: dau o precipitare încrucișată; *b* — A_1 și A_2 sînt identici: zona lor de precipitare se întîlnește pe același arc; *c* — antigenul A_1 prezintă o identitate parțială cu antigenul A_2

Tehnica difuziunii duble (după Elek, 1949). În varianta lui Elek antigenii și serurile nu sînt repartizate în

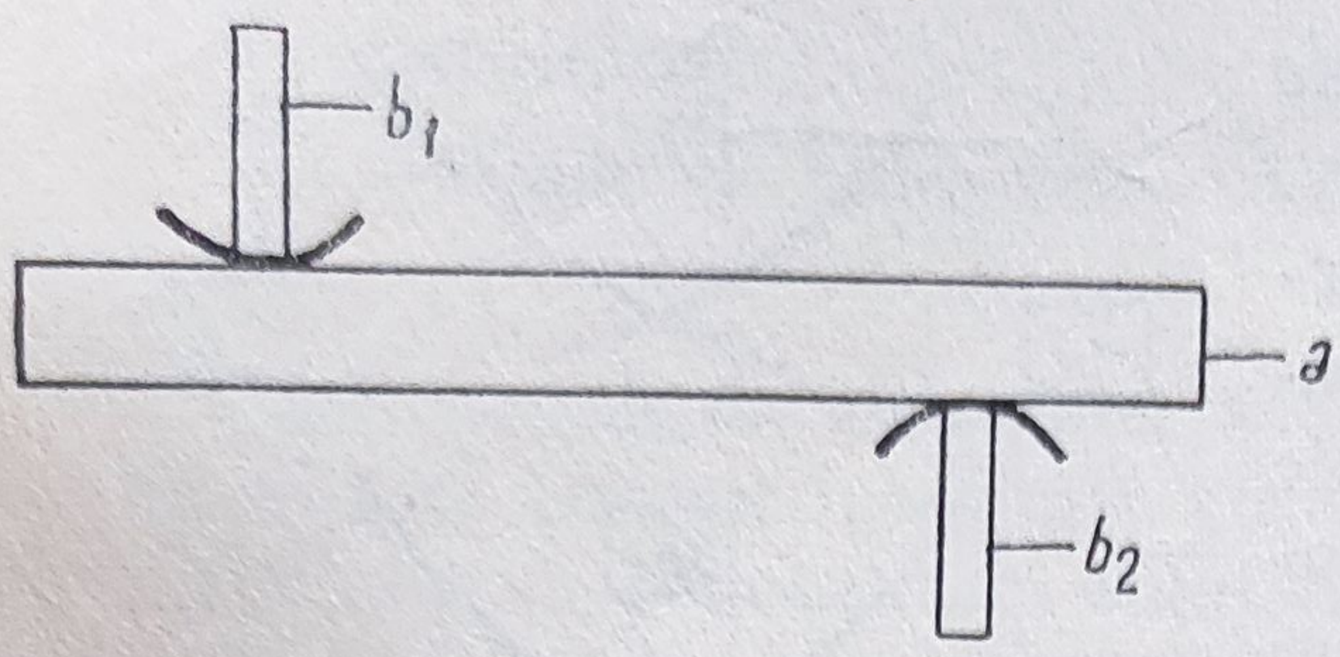


Fig. 17 — Schema reacţiei de precipitare în gel de agar (după V i d a l). Tehnica difuziunii duble (după E l e k):

a — hîrtie de filtru îmbibată cu ser; b_1 şi b_2 — hîrtii de filtru îmbibate cu soluţii de antigeni. Antigenul sau anticorpul difuzează pornind de la benzi de hîrtie de filtru dispuse perpendicular

godeuri. Benzi de hîrtie de filtru se îmbibă cu elementele respective şi se aşază apoi pe suprafaţa gelului în poziţii perpendiculare unul faţă de celălalt. Arcurile de precipitare apar în unghi faţă de benzi (fig. 17).

IMUNOELECTROFOREZA

Este o variantă a reacţiei de seroprecipitare în care unul din elemente este separat în fracţiuni printr-o operaţie de electroforeză, iar celălalt este integral. Reacţia este în mică măsură folosită în bacteriologie, avînd aplicaţie mai mult în domeniul analizei imunologice şi imunochimice a diferitelor seruri. Principiul metodei este următorul:

— Elementul, care urmează să constituie antigenul din reacţie, se supune mai întîi electroforezei în gel de agar sau de agaroză.

— După aceea, pe marginea sau în centrul lamei cu gel se excavează un şanţ care se umple cu serul imun integral.

— În etapele următoare, reacţia nu se deosebeşte de imunodifuzie. Arcurile de precipitare apar pe marginea şanţului, spre care sînt orientate convex. Numărul arcurilor este de regulă mai mare ca în cazul imunodifuziei, reacţia permiţînd o analiză imunologică mai de detaliu a antigenului respectiv.

— După citirea reacţiei, preparatele pot fi tratate la fel ca cele din imunodifuzie (prin spălare, uscare, colorare) în scopul conservării lor pe timp nelimitat.

REACŢIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI (R.F.C.)

Elementele necesare reacţiei sînt: antigenul, serul de examinat, serul normal proaspăt de cobai (alexină), suspensia de globule roşii de oaie şi serul hemolitic antioaie. Înainte de a fi introdus în reacţie, serul de examinat se inactivează; de asemenea şi serul hemolitic antioaie. Reacţia se desfăşoară în două etape:

Etapa I. Se pune în contact în tuburi de reacţie antigenul cu serul de examinat. Aceste două elemente constituie sistemul bacterian, care este sistemul esenţial din reacţie; se adaugă alexină. Se pun tuburile la termostat la 37°C, timp de 30 minute. Examinînd tuburile după această primă etapă nu se va observa nici o modificare vizi-

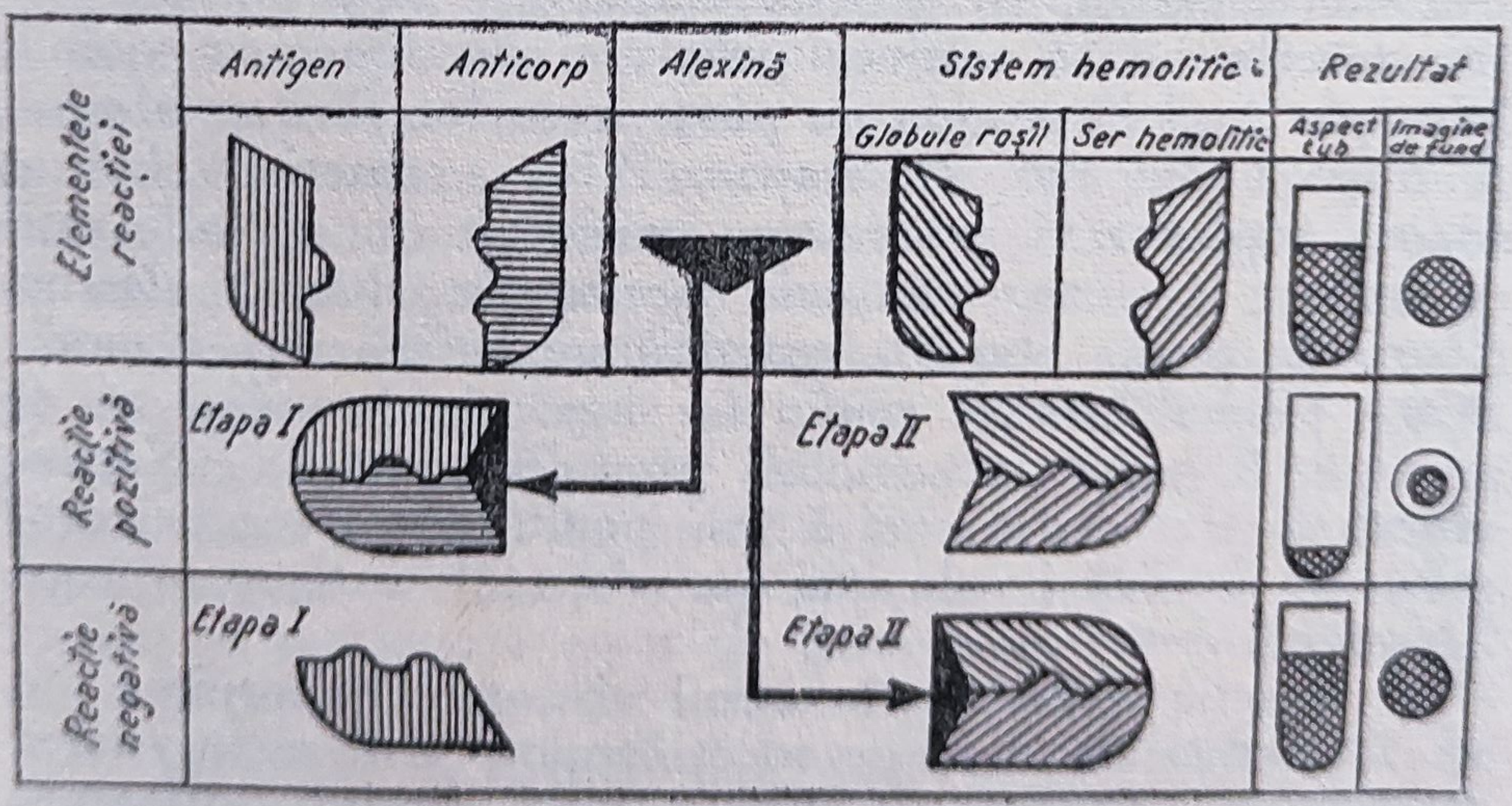


Fig. 18 — Schema reacţiei de fixare a complementului

bilă. Pentru a putea pune în evidenţă existenţa sau inexistenţa unei reacţii antigen-anticorp-alexină, se trece la etapa a II-a.

Etapa a II-a. În această etapă se adaugă în tubul de reacţie un amestec din suspensia de globule roşii de oaie şi serul hemolitic antioaie. Acest amestec se prepară cu 45 minute înainte de a fi introdus în reacţie, constituind sistemul hemolitic, care este un sistem indicator. Se pun tuburile din nou la termostat la 37°C timp de 15 minute, după care se face o citire provizorie. Citirea definitivă se face la 24 ore. În etapa a II-a are loc sau nu hemoliza, fenomen vizibil, a cărui absenţă sau prezenţă indică pozitivitatea sau negativitatea reacţiei. Analizînd fenomenele care se petrec în cele două etape ale reacţiei, trebuie explicate, pe rînd, cele două alternative posibile: a reacţiei pozitive şi a reacţiei negative.

— Reacţia pozitivă presupune prezenţa în ser a anticorpilor specifici. În prima etapă a reacţiei, antigenul se cuplează cu anticorpii din ser şi reacţia are loc datorită prezenţei alexinei. În această etapă, aşa cum s-a menţionat, reacţia nu se traduce prin nici un fenomen vizibil. Ştiut este însă că reacţia nu poate avea loc fără ca alexina să dispară din tub. În etapa a II-a a reacţiei, cînd se adaugă cuplul antigen-anticorp constituit din globule roşii de oaie şi anticorpi antioaie, acesta, în absenţa alexinei (fixată în prima etapă a reacţiei) nu suferă nici o modificare. Globulele roşii rămîn în suspensie, hemoliza nu se produce. Reacţia de hemoliză este deci negativă. Negativitatea acestei reacţii indică însă pozitivitatea reacţiei propriu-zise a fixării alexinei pe sistemul antigen-anticorp bacterian.

— Reacţia negativă, în cazul absenţei anticorpilor din ser se traduce în mod invers, şi anume prin pozitivitatea reacţiei de hemoliză. În prima etapă lipsind anticorpii, antigenul nu are cu cine să se cupleze, iar alexina rămîne

liberă în tub. În etapa a II-a, adăugînd globule roșii de oaie cuplate cu anticorpii antioaie, alexina rămasă liberă se va fixa pe acest cuplu și va provoca hemoliza. Reiese clar că citirea reacției de fixare a complementului se face prin intermediul reacției de hemoliză, a cărei pozitivitate sau negativitate indică rezultatele inverse ale R.F.C. Reacția de hemoliză este în cazul de față o reacție adjuvantă și indicatoare în cadrul reacției complexe a fixării complementului (fig. 18).

La executarea reacției se cere o deosebită atenție și minuțiozitate în dozarea elementelor, atît sub aspectul volumului, dar mai ales al titrului. Fiecare din elemente este titrat în prealabil și se utilizează în reacție în volumul indicat de protocol și diluat conform titrului, ceea ce constituie doza de lucru a elementului respectiv.

Un alt element de care trebuie să se țină seama îl constituie anticomplementaritatea pe care o posedă unii antigeni sau unele seruri. Prin anticomplementaritate sau putere anticomplementară se înțelege proprietatea pe care o au unii antigeni și unele seruri de a fixa singure alexina, în absența unui cuplu antigen-anticorp. Acest inconvenient poate fi înlăturat uneori, prin diluare. Astfel de elemente anticomplementare pot fi utilizate în reacție atunci cînd diluția în care se manifestă activitatea anticomplementară nu coincide sau nu depășește doza de lucru.

Reacția poate fi executată după diverse tehnici, în funcție de specia microbiană sau chiar pentru aceeași specie pot exista mai multe tehnici descrise de mai mulți autori. În laboratoare, tehnicile sînt indicate prin protocoale de lucru, după care se ghidează tehnicienii care execută reacțiile. Redăm în continuare aspectele principiale privind pregătirea și titrarea elementelor necesare reacției:

1. Antigenul se prepară prin tehnici care diferă de la o specie microbiană la alta, fiind constituit în majoritatea cazurilor din suspensii de germeni care se supun la diferite

prelucrări. În vederea înlăturării proprietăților anticomplementare pe care le au unii antigeni se folosesc diferite procedee ca: tratarea cu eter, cloroform, acetonă, congelări și decongelări succesive etc. Toți antigenii se titrează din punctul de vedere al puterii fixatorii, iar pentru cei anticomplementari, se procedează și la titrarea puterii lor anticomplementare.

Titrarea puterii fixatorii a antigenului constă, în principiu, în repartizarea acestuia în cantități crescînde, de regulă de la 0,1 pînă la 0,8 ml, urmată apoi de executarea cîte unei R.F.C. complete cu fiecare tub în parte, folosind un ser standard pozitiv cu titrul cunoscut. Titrul puterii fixatorii este reprezentat de cantitatea minimă de antigen capabilă să producă R.F.C. intens pozitivă (să nu existe cea mai mică urmă de hemoliză). La titrarea puterii fixatorii a antigenului este obligatoriu un martor pentru serul pozitiv, în care antigenul este substituit cu diluant. Hemoliza totală din tubul-martor indică lipsa oricărei anticomplementarități a serului standard.

Titrarea puterii anticomplementare se execută în aceleași condiții, cu singura deosebire că serul pozitiv se înlocuiește cu diluant. Un antigen care fixează alexina singur, împiedicînd hemoliza la un titru egal sau apropiat de titrul fixator, nu poate fi întrebuințat în reacție.

Unii antigeni sînt preparați de către biofabrici, în țara noastră de către Institutul „Pasteur“ și livrați laboratoarelor județene în fiole pe care sînt înscrise durata valabilității și titrul, conform căruia trebuie să fie diluat pentru a fi utilizat în R.F.C.

2. Serul de examinat trebuie să fie proaspăt cu o vechime de cel mult 1—2 zile din momentul recoltării. Trebuie eliminate serurile hemolizate sau infectate cu bacterii sau ciuperci. Serurile se decantează; în cazul cînd în timpul decantării au trecut globule roșii, acestea se lasă să se depună sau se centrifughează și serurile perfect limpezi

sînt introduse în reacţie. Înaintea executării reacţiei, serurile după diluare se inactivează prin încălzire la 56°C timp de 30 minute.

Pe lîngă probele de ser de examinat mai sînt necesare seruri cunoscute, pozitive, negative şi dubioase, cu care se execută reacţii-martor indicatoare pentru corectitudinea execuţiei şi exactitatea titrării şi folosirii tuturor elementelor.

3. Alexina este reprezentată de serul proaspăt de cobai mascul. Sîngele se recoltează prin puncţia cordului. Cobaii ţinuţi în acest scop nu trebuie sîngeraţi la intervale mai mici de o lună. Cantitatea de sînge care se obţine la o recoltare este de 8—10 ml. Sîngele obţinut se centrifughează 20 minute la 3 000 t/minut după care se decantează serul. Serul poate fi păstrat 2—3 zile la gheţar. Alexina poate fi păstrată un timp mai îndelungat, dacă se recurge la una din metodele de conservare, cum sînt: saramurarea, congelarea, liofilizarea etc.

Titrarea alexinei trebuie făcută zilnic, înainte de a începe reacţiile de fixare a complementului, datorită faptului că titrul se poate modifica de la o zi la alta. Alexina se titrează, de obicei, în diluţia 1/20. Alexina se repartizează în tuburi în cantităţi crescînde, se aduce la acelaşi volum cu diluant şi se adaugă în fiecare tub aceeaşi cantitate de sistem hemolitic (tabelul 35).

Titrul alexinei este reprezentat de cantitatea minimă de alexină care a fost capabilă să producă o hemoliză totală. Pentru desemnarea cantităţii minime hemolizante de alexină se foloseşte şi termenul de „unitate de alexină". În majoritatea tehnicilor folosite pentru R.F.C., alexina se introduce în reacţie în doză de 2 unităţi. La titrarea alexinei se face o reacţie-martor pentru sistemul hemolitic, în care alexina este substituită cu diluant. Reacţia-martor trebuie să nu prezinte hemoliză.

TABELUL 35

Schema titrării alexinei

Elemente	I	II	III	IV	V	VI	VII	Martor-sistem	
Alexină 1/20	0,1 ml	0,13 ml	0,16 ml	0,19 ml	0,22 ml	0,25 ml	0,28 ml	0,31 ml	1,5 ml
Ser fiziologic	1,4 ml	1,37 ml	1,34 ml	1,31 ml	1,28 ml	1,25 ml	1,22 ml	1,19 ml	
Sistem hemolitic	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

15 minute la baia de 37°C

4. Suspensia de globule roşii de oaie se pregăteşte astfel: se recoltează aseptic sînge din vena jugulară de la oaie, într-un balon cu perle, steril. În timpul sîngerării şi încă 10—15 minute după sîngerare, balonul se agită continuu, în vederea defibrinării. Se trece apoi sîngele în tuburi de centrifugă şi se centrifughează 10 minute la 3 000 ture/minut. Se decantează plasma şi se spală sedimentul de globule de 2—3 ori cu apă fiziologică prin centrifugări şi decantări succesive, pînă cînd supernatantul rămîne perfect limpede şi incolor, ceea ce arată că orice urmă de plasmă a fost îndepărtată. Din depozitul de globule astfel obţinut se utilizează în reacţie o suspensie de 2,5% în apă fiziologică. Globulele roşii sub formă de depozit de centrifugare pot fi păstrate timp de mai multe zile la frigider. Spălarea cu apă fiziologică trebuie însă repetată cel puţin o dată, înainte de prepararea suspensiei pentru R.F.C., de-

oarece de la o zi la alta, parte din globulele roşii se hemolizează şi trebuie îndepărtate pentru a nu provoca erori în interpretarea reacţiei.

Folosind anumite soluţii conservante globulele roşii pot fi conservate un timp mai îndelungat. Astfel, soluţia Alsever permite conservarea globulelor roşii pînă la 10 săptămîni. Compoziţia acestei soluţii, modificată de Bukantz, Rein şi Kent, este următoarea:

— glucoză	24,6 g
— citrat de sodiu	9,6 g
— clorură de sodiu	5,04 g
— apă distilată (filtrată prin filtru de sticlă Schott 11 G 5)	1200 ml

Pentru a imprima un grad mai mare de uniformitate reacţiilor executate în diferite laboratoare, s-a propus standardizarea optică a suspensiei de globule roşii, realizată pe baza pregătirii ei cu anumiţi diluanţi, a aprecierilor fotometrice ale mai multor probe hemolizate care au permis stabilirea unor coeficienţi de calcul necesari pregătirii suspensiilor.

5. Serul hemolitic antioaie (hemolizina) se prepară pe iepuri după diferite protocoale; un protocol care permite obţinerea unor seruri hemolitice cu un titru ridicat (pînă la 1/60 000 nediluat) este cel propus de Ulrich şi McArthur modificat de Ruge (1959) (tabelul 36).

Intervalele dintre 2 inoculări de ser din săptămîna a 2-a şi dintre inocularea serului şi a suspensiei de globule roşii din săptămînile 3 şi 4 este de 30 minute. Serul astfel preparat nu-şi modifică titrul timp de 18 luni. Serul se controlează din punctul de vedere al sterilităţii, iar în cazul cînd nu este steril, se sterilizează prin filtrare, apoi se inactivează, se titrează şi se fiolează. Pe fiolă este înscrisă durata valabilităţii şi titrul. În vederea unei mai bune păstrări a serului hemolitic, acesta se amestecă în

TABELUL 36

Protocol de prepararea unui ser hemolitic antioaie

Săptă-mîna	Ziua	Doza de ser de oaie inoc. (ml)		Doza de suspensie 10% globule roşii de oaie inoculată (ml)
		inoc. 1	inoc. 2	
1	2	3	4	5
1	miercuri vineri	0,5 1,0		
2	luni miercuri vineri	0,2 0,2 0,2	1,3 1,8 2,3	
3	miercuri vineri	— 0,2		1,0 2,0
4	luni miercuri	0,2 0,2		3,0 4,0
5	luni		sîngerare	

părţi egale cu glicerină neutră sau se adaugă mertiolat de sodiu în proporţie de 1/5000—1/10 000.

Titrarea serului hemolitic constă în executarea de diluţii succesive de ser hemolitic, la care se adaugă suspensie de globule roşii de oaie şi alexină. Titrul serului este reprezentat de diluţia maximă, capabilă să producă hemoliza totală.

Sistemul hemolitic se obţine amestecînd părţi egale din suspensia de globule roşii în apă fiziologică 2,5% şi serul hemolitic antioaie, într-o diluţie de 4 ori mai mică în raport cu titrul. Amestecul se ţine timp de 45 minute la baia de 37°C.

În vederea executării suspensiilor, diluţiilor şi, în general, a tuturor operaţiilor necesare în R.F.C. se pot folosi următorii diluanţi:

— soluție cloruro-sodică izotonică cu 0,85% NaCl la pH 7,2—7,4

— soluția tampon veronal (Mayer), avînd următoarea compoziție:

— veronal	4,5 g
— $MgCl_2 + 6\,H_2O$	1,0 g
— $CaCl_2 + 2\,H_2O$	0,2 g
— apă distilată fierbinte	500 ml

După dizolvarea substanțelor se mai adaugă:

— veronal sodic	3 g
— CO_3HNa	2,52 g
— NaCl	83,8 g

După răcirea soluției volumul se completează cu apă distilată la 2 000 ml. Soluția trebuie să aibă un pH final de 7,3—7,4. Se filtrează prin filtru de sticlă și se păstrează la frigider. În momentul folosirii se diluează cu 4 volume apă bidistilată. Soluția tampon veronal este astăzi din ce în ce mai mult folosită, fiind superioară soluției de apă fiziologică.

În vederea executării reacției, serurile de examinat sînt distribuite în cantitate de cîte 0,1 ml în tuburi de reacție, completîndu-se volumul pînă la 0,5 ml cu cîte 0,4 ml soluție cloruro-sodică izotonică. Serurile se inactivează la baia de 56°C timp de 30 minute. După inactivare se adaugă fiecărei probe cîte 0,5 ml de suspensie antigen, diluat conform titrului. Se adaugă alexină, diluată conform titrului în cantitate de 0,5 ml. Volumele elementelor cu care se lucrează diferă de la o tehnică la alta. Ca recomandare generală, indiferent de tehnica aplicată, volumul total al elementelor nu trebuie să fie mai mic de 1 ml și nici mai mare de 2,5 ml. Se pun probele la 37°C pentru 30 minute, timp în care se produce prima etapă a reacției. Se scot probele din baie sau de la termostat și se adaugă în fiecare tub cîte 1 ml sistem hemolitic. Se pun tubu-

rile din nou la 37°C pentru 15 minute, după care se face citirea. Paralel, se execută reacţii martor cu seruri standard pozitive, negative şi dubioase. Pentru a uşura munca lucrătorilor, care execută probe de R.F.C. şi a-i scuti de calcularea cantităţilor de elemente necesare în funcţie de numărul de probe, după cum şi de calcularea diluţiilor în funcţie de titru, există în toate laboratoarele în care se execută aceste reacţii, tabele cu calculele gata făcute, după care se execută aceste operaţiuni, cu un consum minim de timp.

Sub forma în care a fost descrisă, rezultă că R.F.C. oferă numai indicaţii calitative, privind prezenţa sau absenţa anticorpilor dintr-un ser. Reacţia permite însă şi determinarea titrului de anticorpi fixatori (sensibilizine) din ser, dacă se fac din proba respectivă diluţii succesive şi se execută cu fiecare diluţie în parte, cîte o reacţie completă. Titrul serului va fi dat de diluţia maximă capabilă să producă R.F.C. pozitiv. În ultimul timp, se aplică pe o scară din ce în ce mai largă tehnici care în locul tuburilor folosesc plăcile din material plastic cu godeuri. Aceste tehnici au avantajul folosirii unui volum mai redus de elemente. Ele se aplică mai ales cînd se lucrează cu seruri sau antigeni greu de obţinut. Plăcile pot fi utilizate şi pentru micrometode, care folosesc cantităţi foarte mici din elemente (pînă la 0,025). În acest caz, diluţiile se execută cu anse calibrate.

Interpretarea reacţiei se face în două etape: citire provizorie, imediat după scoaterea probelor din baia de 37°C şi o citire definitivă, după 24 ore. Citirea provizorie permite observarea prezenţei sau absenţei hemolizei. Citirea definitivă, după sedimentarea globulelor roşii, oferă posibilitatea aprecierii intensităţii hemolizei.

Intensitatea hemolizei se interpretează în funcţie de mărimea depozitului de globule roşii şi de cantitatea de globule lizate, care se deduce din culoarea supernatantului.

Notarea rezultatelor se face în felul următor:

++++ = lipsa oricărei urme de hemoliză — globulele roşii sedimentate 100% la fundul tubului, supernatantul incolor sau uşor gălbui (culoarea serului);

+++ = există urme de hemoliză — depozit mare de globule; sedimentul cuprinde peste 50% din globule, supernatantul uşor roz;

++ = hemoliză parţială — depozitul cuprinde aproximativ 50% din globule, supernatantul colorat în roz;

+ = hemoliză parţială — depozit mic, cuprinzînd mai puţin de 50% din globule, supernatantul roz intens;

± = hemoliză aproape completă — depozit infim, supernatantul roz intens;

— = hemoliză completă — depozit inexistent, toată masa lichidului este colorată uniform în roz intens.

Aprecierea hemolizei se face, de regulă, cu ochiul liber. O apreciere mai exactă a gradului de hemoliză din fiecare tub se poate face folosind fie un fotocolorimetru, fie un spectrofotometru, fie o scară de hemoliză.

În ultimul timp, s-a introdus în interpretarea R.F.C. aprecierea hemolizei de 50%. În acest caz se impune, în primul rînd, o rigurozitate deosebită în execuţia tehnică a reacţiei, interpretarea rezultatelor cu scara de hemoliză sau prin determinarea fotocolorimetrică, după care se stabileşte valoarea hemolizei 50% folosind anumite metode de calcul.

În afara R.F.C. descrisă mai sus, care poate fi considerată clasică, mai există şi alte variante ale reacţiei de fixare a alexinei.

R.F.C. la rece. Diferă principial de tehnica clasică prin faptul că fixarea alexinei pe sistemul antigen anticorp microbian (în prima etapă a reacţiei) are loc la +4°C. În aceste condiţii, pentru fixarea alexinei este necesar un timp mai lung. De aceea, tuburile în care s-a repartizat antigenul, anticorpul şi alexina sînt ţinute timp de 18 ore la frigider. Această variantă s-a dovedit mai sensibilă în decelarea anticorpilor fixatori din unele infecţii bacteriene

(de ex., tuberculoza), cît şi în diagnosticul unor viroze.

R.F.C. indirectă sau reacţia de inhibare a fixării complementului. Această reacţie se practică pentru serurile unor specii de păsări (găini, raţe etc.) în care apar în cazul anumitor infecţii anticorpi care inhibă fixarea alexinei pe complexul antigen-anticorp. Fenomenul care este urmărit prin această reacţie este punerea în evidenţă a antigenului, care în cazul prezenţei anticorpilor se cuplează cu aceştia, iar în cazul absenţei lor rămîne liber.

Şi într-un caz şi în celălalt alexina rămîne liberă în tub. Pentru a pune în evidenţă cuplarea antigenului cu anticorpul se adaugă un ser cunoscut pozitiv, dar care împreună cu antigenul fixează alexina (ser indicator). După aceea reacţia se execută în continuare după tehnica obişnuită.

Dacă în serul examinat au existat anticorpi inhibanţi ai R.F.C., ei s-au cuplat cu antigenul blocîndu-l; serul pozitiv indicator a rămas liber, alexina a rămas, de asemenea, liberă şi se va fixa pe sistemul hemolitic producînd hemoliza. Prezenţa hemolizei este deci indicatoare pentru reacţia pozitivă de inhibare a fixării complementului.

Dacă în serul examinat n-au existat anticorpi inhibanţi ai R.F.C. antigenul a rămas liber, serul pozitiv indicator s-a fixat pe antigen şi a fixat alexina, iar hemoliza nu se va produce datorită absenţei alexinei. Absenţa hemolizei este deci indicatoare pentru reacţia negativă de inhibare a fixării complementului.

R.F.C.I. are aplicaţii, în special, în diagnosticul unor viroze şi rickettsioze.

Imunofluorescenţa

Principiul acestei metode constă în reacţia dintre antigen şi anticorpi cuplaţi în prealabil cu o substanţă fluo-

rocromă (fluorescentă în spectru ultraviolet). Interpretarea reacţiei se face cu ajutorul unui microscop special adaptat examenului în fluorescenţă. Anticorpii cuplaţi cu o substanţă fluorescentă în contact cu antigenul specific dau naştere unui complex fluorescent în spectru ultraviolet. Metoda a fost imaginată de Coons şi Creech (1941) şi Coons şi Kaplan (1950) şi s-a extins de atunci la un număr mare de specii microbiene. Un studiu amplu privind imunofluorescenţa a fost elaborat în ţara noastră de A. Feţeanu (1971). Reacţia poate fi executată prin două metode: una directă şi alta indirectă.

Metoda directă are ca principiu punerea în contact a antigenului cu serul fluorescent specific. Reacţia se desfăşoară conform schemei din fig. 19. Pentru executarea aces-

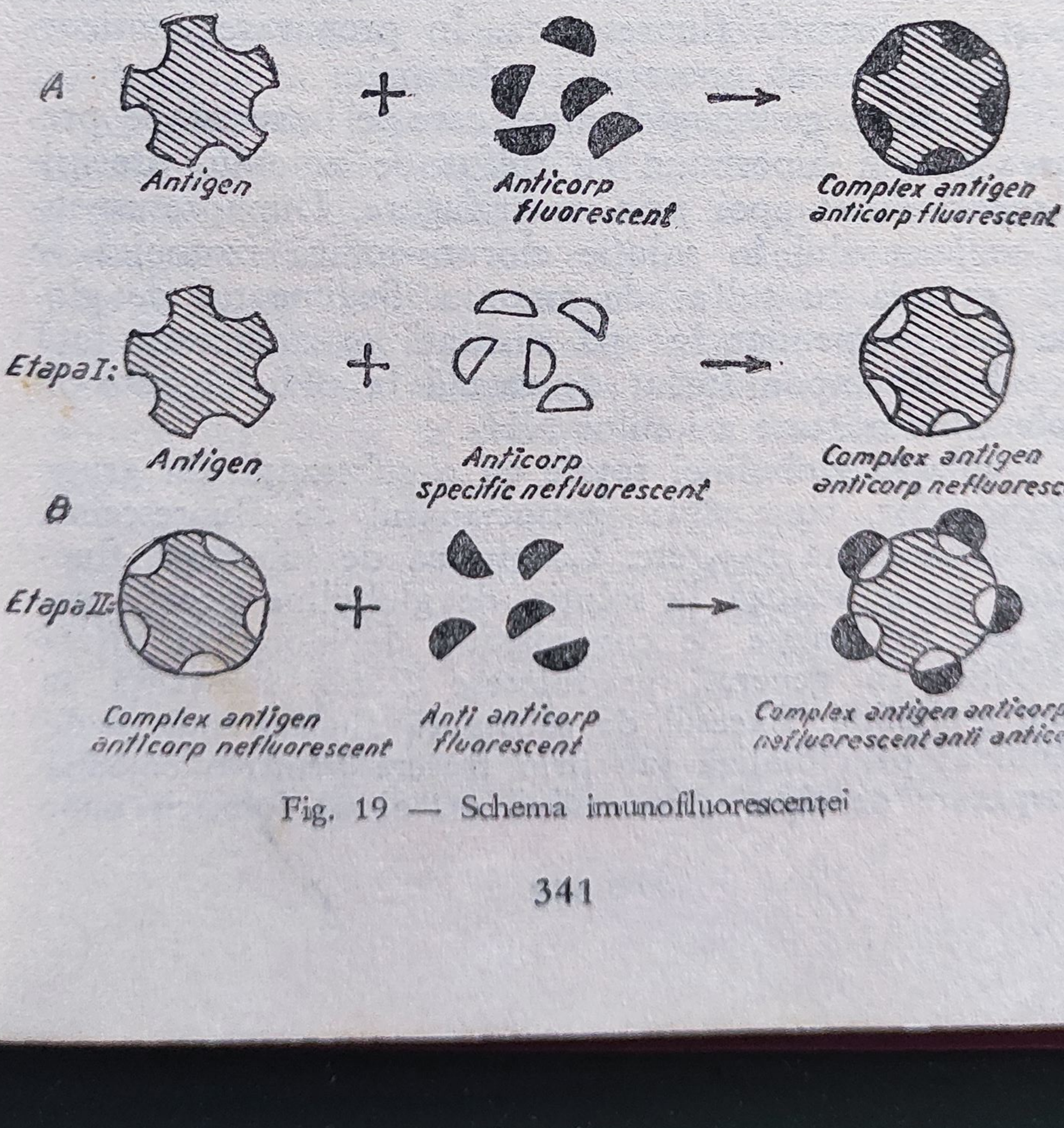


Fig. 19 — Schema imunofluorescenţei

tei metode sînt necesare ca aparatură, instrumentar şi substanţe următoarele:

Microscopul cu fluorescenţă foloseşte ca sursă de lumină un fascicul de raze ultraviolete sau de lumină albastră, care sînt trecute prin filtre speciale ce reţin celelalte raze. Microscopul propriu-zis este identic cu cel obişnuit. Peste ocular se montează un filtru de sticlă galbenă, care opreşte razele ultraviolete.

Antigenul de cercetat nu diferă de antigenii folosiţi în alte reacţii serologice, putînd fi reprezentat de o suspensie bacteriană. Antigenul se etalează totdeauna pe lamă sub forma unui frotiu. Frotiurile executate din antigen trebuie să fie cît mai subţiri. Fixarea lor se face, de obicei, în acetonă.

Anticorpii fluorescenţi se prepară prin cuplarea a două elemente: anticorpii purificaţi sub formă de gammaglobuline şi o substanţă fluorescentă. În prepararea anticorpilor distingem două operaţiuni principale:

— Prepararea gammaglobulinei care se bazează pe precipitarea serului hiperimun cu sulfat de amoniu, precipitatul separîndu-se apoi prin centrifugare. După resuspendarea sedimentului în soluţie cloruro-sodică izotonică se repetă tratarea cu sulfat de amoniu. Sedimentul de globuline final suspendat în apă distilată se dializează faţă de o soluţie tampon fosfat de regulă la pH 7,0 pînă la completa îndepărtare a ionilor NH_4.

— Cuplarea globulinei totale cu o substanţă din grupa fluorocromilor, cum sînt: izotiocianatul de fluoresceină, rhodaminlissamina B_{200} etc. Cantitatea de substanţă fluorescentă ce se adaugă la soluţia de globuline pentru cuplare este în funcţie de concentraţia de globulină aflată în soluţie. În general, se folosesc 5 mg substanţă la 10 mg globulină. Excesul de substanţă fluorescentă poate fi eliminat prin dializă sau prin trecere printr-o coloană de separare de tipul sefadexului. În cazul folosirii unor

seruri care conţin şi anticorpi nespecifici, aceştia se îndepărtează prin adsorbţie. În cazul cînd serul produce încă fluorescenţă nespecifică, este supus unor operaţiuni de adsorbţie cu praf de ficat de şoarece, uscat în acetonă. Pregătirea serului fluorescent este o operaţie laborioasă şi implică multă corectitudine şi finețe. Greşeli de tehnică în pregătirea anticorpilor fluorescenţi constituie deseori cauze ale unor reacţii nespecifice.

Pentru executarea reacţiei se procedează astfel:

— Frotiul ce conţine antigenul, după uscare, se acoperă cu serul fluorescent. Durata colorării este variabilă 10—30 minute, în funcţie de specia microbiană. Colorarea se face, de obicei, într-o atmosferă umedă şi la temperatura de 37°C.

— Se varsă serul fluorescent şi se spală lama bine cu soluţie fiziologică tamponată la pH 7,0.

— După uscare, lama se aşază pe platina microscopului după ce în prealabil s-a depus pe lentila condensatoare o picătură de lichid de imersie (de preferinţă glicerină chimic pură nefluorescentă). Lichidul de imersie se pune şi deasupra frotiului, după care se începe examinarea. Condensatorul trebuie să fie ridicat, pînă cînd lichidul de imersie aderă de dosul lamei. Cu obiectivele mici se urmăreşte centrarea fasciculului luminos, iar cu obiectivul de imersie se face examinarea propriu-zisă. Pentru o examinare mai bună se recomandă ca examenul să se facă într-o cameră întunecată.

Interpretarea reacţiei se face pe baza următoarelor criterii: reacţia pozitivă se concretizează prin luminescenţa microbului antigen din frotiu. În cazul reacţiei negative, germenul nu prezintă luminescenţă. Culoarea luminescentă a preparatului depinde de fluorocromul folosit. În cazul izothiocianatului de fluoresceină ea este galbenă-verzuie, iar în cazul rhodaminei este galbenă-portocalie.

Metoda indirectă are ca principiu punerea în contact a antigenului cu gammaglobuline specifice nefluorescente. În urma cuplării dintre antigen şi anticorp nu se produce o reacţie fluorescentă. În a doua etapă a reacţiei, cuplul antigen-anticorp microbian este pus în contact cu un anti-anticorp fluorescent.

Pentru executarea reacţiei sînt necesare aceleaşi materiale, ca în cazul reacţiei directe. În plus, trebuie însă pregătit un ser anti faţă de globulina specifică. În acest scop, se prepară mai întîi serul specific antimicrobian, din care se extrag gammaglobulinele prin precipitare cu sulfat de amoniu. Acestea nu sînt însă utilizate pentru prepararea anticorpilor fluorescenţi; ele servesc la prepararea unui alt ser antigammaglobulinic. Cel de al doilea ser este întrebuinţat la prepararea anticorpilor fluorescenţi pe baza aceloraşi principii de tehnică. Timpii de executare ai reacţiei se succedă în cadrul acestei metode în felul următor:

— Antigenul etalat în frotiu se tratează cu serul antimicrobian specific nefluorescent. Se lasă în contact timp de 10—30 minute la 37°C în atmosferă umedă.

— Se spală lama cu soluţie fiziologică tamponată la pH 7,0.

— Se acoperă lama cu serul antiglobulinic fluorescent specific faţă de serul antimicrobian. Se ţine tot 10—30 minute la temperatura umedă de 37°C.

— Se spală din nou frotiul cu soluţie fiziologică tamponată, se usucă şi se examinează.

Metoda indirectă prezintă avantajul unei fluorescenţe mai intense şi mai specifice în comparaţie cu metoda directă.

Tehnica fixării (colorării) complementului. Constă în aplicarea imunofluorescenţei ca o variantă tehnică a R.F.C., în care sistemul hemolitic este substituit cu anticorpi fluorescenţi antialexină. În acest caz, frotiul cu antigenul se

tratează într-o primă fază cu serul specific la care se adaugă ser normal purificat de cobai mascul (alexină), iar în faza a 2-a cu un ser antialexină fluorescent. Fluorescenţă are în acest caz semnificaţia diagnostică pe care o are hemoliza în R.F.C. Este posibilă şi o tehnică indirectă analoagă cu R.F.C.I., în care după tratarea frotiului cu serul specific şi alexină se adaugă mai întîi un ser antialexină nefluorescent şi apoi unul fluorescent. În acest caz, semnificaţia diagnostică a fluorescenţei este inversă faţă de tehnica directă.

REACŢIA DE SERONEUTRALIZARE

Pentru identificarea prezenţei unor toxine bacteriene sau diferenţierea tipurilor toxice în cadrul unei specii, se foloseşte proba seroneutralizării care constă principial în următoarele:

— Se pune în contact un ser cunoscut cu toxina de cercetat, se omogenizează amestecul şi se lasă la temperatura camerei sau la termostat timp de 1/2—1 oră, timp necesar formării cuplului antigen-anticorp.

— Se inoculează amestecul de preferinţă pe cale intravenoasă la animale de laborator sensibile faţă de toxina bacteriană examinată.

În cazul reacţiei pozitive, cînd anticorpii existenţi în ser au neutralizat toxina, animalele rezistă. În cazul reacţiei negative, anticorpii fiind nespecifici pentru toxina cercetată, animalele mor.

Această reacţie se foloseşte în cazul tipizării tulpinilor de *Cl. perfringens* şi *Cl. botulinum*.

O reacţie asemănătoare folosită în virusologie este reacţia de neutralizare a virusurilor.

Această probă se utilizează în bacteriologie pentru tipizarea unor tulpini bacteriene şi titrarea serurilor imune,

ca şi în virusologie pentru identificarea unor virusuri şi titrarea serurilor antivirotice.

CONSERVAREA SERURILOR

Serurile se obţin din sîngele recoltat steril după coagularea acestuia. După decantare serurile se inactivează prin încălzire la 50—60°C timp de 30 minute. Pentru conservare se pot utiliza:

— Metode fizice — păstrare la +4°C (activitatea serurilor se poate păstra mai mulţi ani);

— congelare la —20°C pînă la —60°C.

— Metode chimice — adăugarea diferitelor antiseptice care nu au nici o acţiune asupra anticorpilor: fenol 0,3—0,5%, chinosol 0,05%; mertiolat 1/10 000—1/20 000.

EXAMENUL PATOGENITĂŢII BACTERIILOR

Unele indicii privind patogenitatea bacteriilor pot fi obţinute pe baza unor teste biochimice, în cazul cînd unele activităţi enzimatice sînt corelate cu intervenţia lor ca factori de agresivitate. Aşa este cazul testului de hemoliză, de coagulare a plasmei citratate etc.

Tehnicile *in vivo* dau indicaţii mult mai precise asupra patogenităţii germenilor. Ele constau în infectarea experimentală a diferitelor animale de experienţă. Prin inoculări experimentale se pot face atît aprecieri calitative privind patogenitatea unei tulpini microbiene cît şi aprecieri cantitative (determinarea gradului de patogenitate al unei tulpini prin D.L.M. sau $D.L._{50}$). În realizarea unei infecţii

experimentale trebuie să ţinem seama de mai mulţi factori şi anume:

— Receptivitatea speciei animale faţă de specia microbiană.

Pentru a se evita pe cît este posibil erorile ce ar rezulta din variabilitatea ce există în cadrul speciei de la individ la individ, în ultimul timp în toate laboratoarele se tinde la standardizarea genetică a materialului. În acest scop, se face selecţie prin creşterea în linii pure. Asemenea linii s-au obţinut la şoareci (liniile SW, RAT de şoareci albi, liniile DBAO-şoareci pigmentaţi cafeniu-deschis, C_{57}-şoareci negri) şi la şobolani (linia Fischer).

— Vîrsta animalului de experienţă (în cercetarea unor specii de virusuri se folosesc, de exemplu, numai şoareci sugari).

— Sexul animalului de experienţă; trebuie să ţinem seama de sex cînd lucrăm cu unele specii microbiene (de ex.: bacilul morvei, *Brucella* etc.) care produc modificări caracteristice la nivelul organelor genitale. *Vibrio fetus* produce avorturi la cobăiţe gestante.

— Calea de inoculare pe care o alegem; pentru aceeaşi specie microbiană infecţia experimentală se realizează mai uşor pe o anumită cale. De exemplu, pentru specia *B. anthracis* infecţia experimentală se produce cel mai uşor pe calea intracerebrală şi intradermică şi mai greu pe cale intraperitoneală sau intravenoasă.

— Doza de germeni: speciile microbiene cu o patogenitate ridicată pot infecta animalele de experienţă în doze foarte mici, în timp ce alte specii microbiene slab patogene nu sînt capabile să infecteze un animal de experienţă decît în doze mari. De exemplu, *B. anthracis* poate infecta şoarecele în doze de 1—2 germeni pe cale subcutană, în timp ce specia *B. cereus*, chiar în cazul cînd se inoculează 0,5 ml cultură în bulion de 24 ore, nu produce constant moartea şoarecilor.

TEHNICA INFECȚIEI EXPERIMENTALE (BIOPROBA)

Infecțiile experimentale se pot realiza pe diferite specii animale. Mai frecvent se folosesc animale mici de laborator, cum sînt: șoarecele alb, cobaiul, iepurele, șobolanul alb, hamsterul. În anumite cazuri se recurge și la animale domestice (cal, vacă, oaie, cîine, pisică etc.) sau sălbatice (maimuță, dihor etc.), uneori la păsări (porumbel, găină) și mai rar la animale cu sînge rece (pești, broaște sau broaște țestoase).

Fiecare laborator de microbiologie are, de regulă, o creșcătorie de animale pentru a-și asigura nevoile privind specificul problemelor de care se ocupă.

Alegerea speciei animale pentru infecția experimentală se face în funcție de specia microbiană cu care se lucrează și scopul lucrării (reproducerea bolii, prepararea serurilor imune etc.).

Marcarea animalelor destinate inoculării se face în cazul șoarecilor prin vopsire în diferite regiuni ale corpului, iar a animalelor mai mari cu mărci metalice.

Inocularea animalelor se poate face pe diferite căi, materialul infectant administrîndu-se pe căi enterale (*per os, per rect)* sau parenterale (mai frecvent subcutan, intradermic, intravenos, intraperitoneal, intramuscular și mai rar alte căi, cum sînt intracerebral, ocular, intranazal, intraarticular).

Contenția animalelor în timpul inoculării poate fi executată de însuși operatorul (de ex., în cazul inoculării subcutanate la șoarece) ori de un ajutor (contenția cobaiului) sau cu un aparat de contenție.

Materialele care se inoculează (culturi, suspensii, broiaje) trebuie să fie cuprinse într-un volum rezonabil, care să nu producă nici o tulburare morfologică sau fiziologică printr-o eventuală acțiune mecanică asupra țesuturilor.

Observaţia animalelor inoculate: animalele inoculate trebuie examinate cu regularitate, în anumite cazuri chiar de mai multe ori pe zi. Examinarea se face în majoritatea cazurilor prin inspecţie, deseori şi prin alte metode, ca: palpaţia, termometria, urmărirea formulei leucocitare etc. Într-o infecţie experimentală se urmăresc, de obicei, următoarele aspecte:

1. durata perioadei de incubaţie;
2. tabloul clinic al bolii şi anume:

a) curba termică deosebit de importantă în infecţiile cobaiului cu leptospire şi rickettsii;

b) prezenţa unor simptome caracteristice din partea anumitor aparate şi sisteme esenţiale ale organismului, ca: tulburări respiratorii, nervoase, digestive, oculare etc.;

c) apariţia unor leziuni caracteristice sesizabile prin examen clinic, de exemplu: edemul cărbunos, în infecţia experimentală cu *B. anthracis*, tumorile emfizematoase de la locul de inoculare în infecţiile cu agenţii gangrenelor gazoase, liza ţesuturilor de la nivelul locului de inoculare produsă de *Cl. histolyticum*, adenita ganglionilor aferenţi şi ulcerul cu supuraţie continuă în tuberculoza experimentală a cobaiului etc.;

d) modificări ale constantelor hematologice;

3. durata infecţiei care variază cu specia microbiană, specia animalului de experienţă şi calea de inoculare (tabelul 41).

În perioada de stare a infecţiei experimentale se procedează pentru unele specii microbiene la examenul bacteriologic al diferitelor materiale recoltate de la animalul bolnav. De regulă aceste materiale sînt fie fragmente de ţesuturi sau organe recoltate prin biopsie, fie sînge recoltat, de regulă, în perioada de vîrf a curbei termice. Recoltarea sîngelui se practică mai ales la iepure şi cobai. În acest scop, animalele se fixează pe aparate de contenţie, iar

Raţii furajere orientative zilnice pentru animale de laborator

Nr. crt.	Specia	Lapte	Pîine	Ovăz	Morcov	Lucernă	Sfeclă	Fîn	Carne crudă
1	Şoarecele alb	5 g	5 g	5 g	—	—	—	—	—
2	Şobolanul alb	15 g	15 g	15 g	5 g	5 g	5 g	—	
3	Cobaiul	—	—	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	
4	Hamsterul auriu	5 10 g	5 10 g	10 15 g	15 20 g	—	15 20 g	10 g	
5	Iepurele de casă	—	—	50 g	—	100 150 g	100 150 g	15 20 g	
6	Dihorul	200 300 g	40 60 g						30 40 g

TABELUL 38

Constante fiziologice legate de reproducţia animalelor de laborator

Nr. crt.	Specia	Vîrsta la care animalul este apt pentru reproducţie	Durata gestaţiei	Numărul produşilor la o fătare	Numărul fătărilor pe an	Vîrsta separării puilor de mamă
1	Şoarece alb	3 luni	19—21 zile	4—8	4—5	4 săptămîni
2	Şobolanul alb	3 luni	25—30 zile	4—8	3—4	3 săptămîni
3	Cobaiul	3—4 luni	61—67 zile	2—4	2—3	15—20 zile
4	Hamsterul auriu	3 luni	16—19 zile	4—10	3	3 săptămîni
5	Iepurele de casă	4—7 luni	30—35 zile	3—10	3—5	5 săptămîni
6	Dihorul		40—42 zile	5—10	1	60 zile

Constantele sanguine

Specia	Numărul de globule roşii (milioane)	Hemoglobina (grade Sahli)	Numărul de globule albe (mii)
Şoarecele alb	6—10	90—97°	5—15
Şobolanul alb	4,7—12,6	93,3—110°	5—21—25,7
Cobaiul	4,5—6	65—95°	8—18
Hamsterul auriu	7,5		8—9
Iepurele de casă	4—6	50	8—12
Dihorul	8,5		8—9
Porumbelul	3,5—4,5	79—96°	7,6—16—23,4
Găina	3—4	50—65°	23—35

sîngele se recoltează prin puncţia cordului. Din sînge se pot executa frotiuri şi, în special, culturi (hemoculturi).

Necropsia animalelor moarte trebuie făcută imediat după moarte sau, în cazul cînd nu este posibil, cadavrele trebuie ţinute la frigider. Pentru autopsia animalelor mici acestea se fixează pe plăci de plută sau în tăvi. După dezinfectarea feţei ventrale se face deschiderea cadavrului, respectînd regulile tehnicii de autopsie.

Se examinează leziunile şi se face examenul microbiologic din organe (frotiuri, culturi, treceri în serie pe alte animale de laborator etc.). În acest scop, se folosesc organele în care germenul se găseşte în cantitatea cea mai

la animalele de laborator

TABELUL 39

Formula leucocitară					
polinucleare neutrofile %	polinucleare eozinofile %	polinucleare bazofile %	limfocite mici %	limfocite mari %	monocite %
12—50	0,5—5,8	0,3—1	37—48,5	11—15	3—10
16—50	1—35	0,2—1	30—53,5	14—24,5	0,5—3,2
20—45	3—20	0,5—3	32—47	6—15	3—10
32	0,5—1		66		2,5
30—50	1—3	0,5—3	35—60	2—9	1—4
65	1		33		1
26—41	1,5—10	2—10,6	42	13,5	3
20—50	2—8	1—5	40—60	5—15	1—4

mare (de ex.: *B. anthracis*-splină, virusul turbării-creier etc.), în cazul infecţiilor bacteriene septicemice însămînţările se fac totdeauna din cord şi os.

Tehnici de determinare a D.L.M. şi a $D.L._{50}$

Doza minimă letală, prescurtat D.L.M., constituie testul prin care se determină gradul de patogenitate a unei tulpini microbiene. D.L.M. reprezintă cantitatea minimă de germeni capabilă să producă o infecţie mortală la o anumită specie animală. În afară de specia şi tulpina micro-

biană şi de specia animală, care constituie factorii esenţiali de care depinde D.L.M., ea mai este în strînsă dependenţă şi de alţi factori, şi anume, calea de inoculare, vîrsta şi greutatea animalelor de experienţă, diluantul folosit pentru executarea diluţiilor seriate.

Materialul microbian, folosit în mod curent pentru determinarea D.L.M. poate fi constituit din:

a) cultură în bulion de 24 ore pentru majoritatea speciilor microbiene;

b) suspensie de germeni într-o soluţie fiziologică rezultată în urma spălării unei culturi pe agar sau în urma suspendării unei cantităţi de germeni recoltată cu ansa sau suspendarea unor depozite de centrifugare a culturilor în medii lichide;

c) broiajele din organe sau alte materiale patologice în care se găsesc germeni. Astfel de broiaje se folosesc pentru determinarea D.L.M. la rickettsii.

D.L.M. se poate exprima fie prin numărul de germeni, fie prin diluţia maximă exprimată exponenţial. Exprimarea prin număr de germeni este posibilă numai în cazul speciilor bacteriene, care pot fi numărate prin una din metodele descrise la pag. 273. Exprimarea prin diluţia maximă care a produs infecţia mortală este mai frecvent folosită şi ea poate să se refere fie la unitatea de volum, în cazul suspensiilor bacteriene, fie la unitatea de greutate, în cazul organelor sau al germenilor raclaţi de pe un mediu solid (de ex.: pentru o tulpină de *B. anthracis*, la care germenii se numără cu uşurinţă, exprimarea D.L.M. se va face sub formă de număr de germeni; pentru o tulpină de *Pasteurella* D.L.M. se va exprima prin diluţia maximă dintr-o cultură în bulion de 24 ore; pentru o tulpină de virusul turbării prin diluţia maximă dintr-o suspensie executată dintr-un gram de creier rabic).

— *Materiale necesare.* Un număr corespunzător de animale de laborator din specia pentru care dorim să deter-

TABELUL 40

Constante fiziologice ale animalelor de laborator

Nr. crt.	Specia	Temperatura normală	Greutatea		Longevitatea
			la fătare	adultului	
1	Șoarecele alb	37—39°C	1 g	18—20 g	3,5—4 ani
2	Șobolanul alb	38,5—39,4°	7 g	120—130g	3—4 ani
3	Cobaiul	37,5—39,5°	40—70 g	400—900g	3—6 ani
4	Hamsterul auriu				3—$3^1/_2$ ani
5	Iepurele de casă	38,5—39,5° (după Marek) 39—40,8° (după Wirth)	50 g	2,5—5 kg	7—8 ani
6	Dihorul	38,3—39,2°	10 g	1,180 kg	5—6 ani
7	Păsări	39,5—44° (după Marek) 40,5—42° (după Wirth)			

TABELUL 41

Receptivitatea animalelor de laborator faţă de unele bacterii importante pentru patologia veterinară

Specia bacteriană	Specia animală	Calea de administrare	Rezultatul şi durata medie a infecţiei
Staph. aureus	iepure	intravenoasă	1—3 zile
	şobolan tînăr	intravenoasă	24 ore—5 zile
Str. equi şi *Str. zooepidemicus*	şoarece	intraperitonel	12—48 ore
Escherichia coli	şoarece	intraperitoneal	12—24 ore
Salmonella	şoarece	intraperitoneal subcutan *per os*	24—48 ore 3—21 zile 3—21 zile
Pasteurella multocida	şoarece	subcutan	24—72 ore
Actinobacillus mallei	cobai	intraperitoneal	5—15 zile
Sphaerophorus necrophorus	iepure	subcutan	3—6 zile
Erysipelothrix insidiosa	şoarece porumbel	subcutan intramuscular	4—6 zile 3—6 zile

Tabelul 41 (continuare)

Specia bacteriană	Specia animală	Calea de administrare	Rezultatul și durata medie a infecției
Listeria monocytogenes	cobai iepure	intraperitoneal conjunctival	3—5 zile 2—3 zile (se vindecă)
M. tuberculosis (toate tipurile)	șoarece	intravenos	20—60 zile
M. tuberculosis tip uman	cobai	subcutan	30—80 zile
M. tuberculosis tip bovin	cobai iepure	subcutan intravenos	30—80 zile
M. tuberculosis tip aviar	găină iepure porumbel	intravenos intravenos intravenos	30—60 zile 18—21 zile 30—80 zile
Bacillus anthracis	șoarece cobai iepure	subcutan	1—7 zile
Agenții gangrenelor gazoase	cobai	intramuscular	24 ore—4 zile

minăm D.L.M.; materialul microbian sub forma în care se obișnuiește să se determine D.L.M. pentru specia microbiană respectivă (de ex.: pentru *Pasteurella animalium* sau b. rujetului — cultură în bulion de 24 ore; pentru virusul pestei porcine — suspensie din ganglioni limfatici sau splină provenind de la un cadavru proaspăt infectat cu germenul respectiv etc.); eprubete sterile, pipete gradate sterile, mojare sterile (în cazul folosirii broiajelor de organe), seringi; un diluant corespunzător, care se alege în funcție de specia microbiană. Mai frecvent se folosesc:

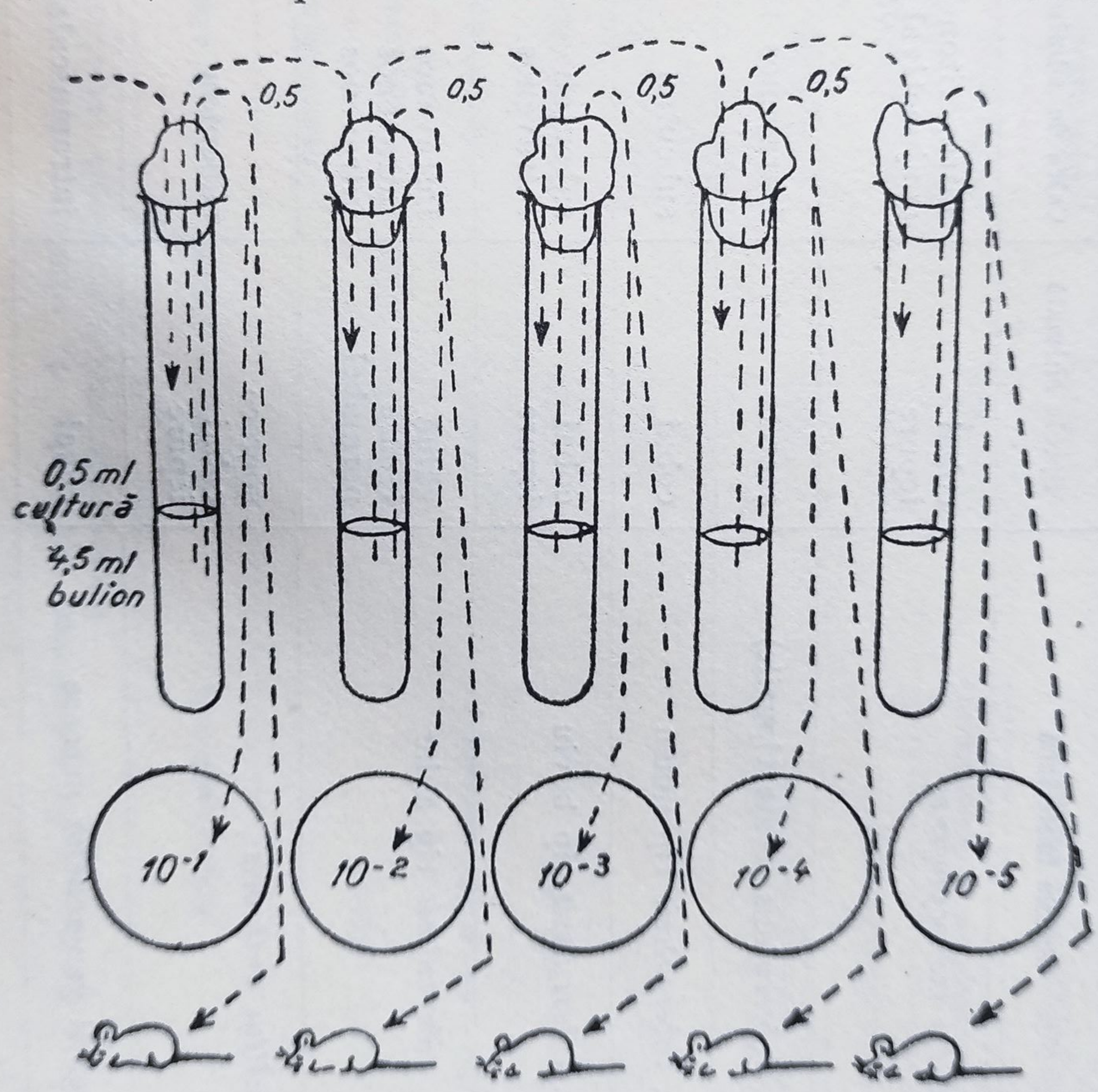


Fig. 20 — Schema determinăni dozei minime letale

bulionul, soluţia cloruro-sodică izotonică şi soluţii fiziologice tamponate pentru un anumit pH.

— *Tehnica de lucru:* se repartizează diluantul în eprubete în condiţii sterile. Cantitatea de diluant este în funcţie de felul în care se execută diluţiile. De regulă, pentru diluţii din 10 în 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} etc.) se repartizează cîte 4,5 ml diluant în fiecare tub. Paralel, se fierb seringile, sterilizatorul rămînînd acoperit pînă în momentul începerii inoculării. Din materialul microbian executăm diluţii seriate în eprubetele cu diluanţi, pregătite în prealabil. În cazul executării diluţiilor din 10 în 10, se repartizează în primul tub cu 4,5 ml diluant, 0,5 ml material microbian, după omogenizare se trec 0,5 ml în eprubeta a doua şi aşa mai departe. În condiţii de lucru riguroase pentru fiecare diluţie trebuie să se folosească altă pipetă gradată sterilă. Imediat după terminarea diluţiilor seriate se trece la inocularea loturilor de animale, începînd cu diluţia maximă (numărul cel mai mic de germeni) şi mergînd spre diluţiile mici — în sensul invers al executării diluţiilor. Aceasta ne permite folosirea aceleiaşi seringi pentru toate diluţiile, fără a fi necesară fierberea ei între diluţii. Din fiecare diluţie se inoculează cîte un lot de cel puţin două animale. Paralel cu inoculările, se execută numărătoarea germenilor în plăci, pentru speciile bacteriene la care se pretează această tehnică. Animalele de laborator se marchează folosind acelaşi semn pentru toate animalele inoculate cu aceeaşi diluţie. Animalele inoculate se ţin sub observaţie o perioadă care corespunde cu intervalul maxim în care specia microbiană inoculată este capabilă să producă infecţii mortale la specia animală respectivă. Animalele găsite moarte se notează în caiet, consemnîndu-se rezultatul examenului bacteriologic. Examenul bacteriologic este obligatoriu, pentru a putea înlătura eventualitatea infecţiilor intercurente.

În condiţiile executării corecte a D.L.M., animalele vor muri într-o anumită ordine. Primele vor muri cele inoculate cu doza maximă de germeni (diluţiile minime). În general trebuie să existe o proporţie inversă între durata infecţiei şi mărimea dozei. Pentru a putea trage concluzii dintr-o lucrare de determinare a D.L.M., este obligatoriu ca animalele inoculate cu diluţiile minime să moară 100%, iar cele inoculate cu diluţia maximă să reziste în proporţie de 100%.

— *Metode de apreciere a D.L.M.:* aprecierea D.L.M. este posibilă sub două forme:

Forma mai simplă, dar mai aproximativă, de apreciere a D.L.M. constă în exprimarea diluţiei maxime, capabile să omoare 100% lotul de animale inoculat. Aproximaţia acestui mod de apreciere constă în faptul că, de regulă, mor animale şi în diluţii superioare dozei care a produs moarte la 100% din animalele inoculate. Aceasta denotă că D.L.M. reală este situată între diluţia maximă care a produs moartea animalelor 100% şi doza la care animalele au rezistat 100%.

Acest inconvenient a impus necesitatea găsirii unei forme de exprimare, care să permită o apreciere mai riguroasă. O formă convenabilă, aplicată astăzi pe o scară largă, constă în exprimarea D.L.M. în doza maximă capabilă să omoare 50% din animalele inoculate. Acest mod de exprimare se notează prescurtat $D.L._{50}$. Pentru calcularea valorii $D.L._{50}$ se folosesc diferite metode. Una din ele este cea preconizată de Reed şi Muench (1938) pe care o redăm în continuare pentru exemplificare. Principiile de lucru care trebuie respectate în aplicarea acestei metode sînt: numărul minim de animale dintr-un lot pentru o doză trebuie să fie 5; diluţia critică 50% trebuie să fie încadrată de cel puţin două diluţii superioare şi două diluţii inferioare; în aflarea rezultatului se aplică metoda totalurilor cumulative, care constă din adunarea

pentru fiecare diluţie a tuturor indivizilor care au murit, plecînd de la diluţiile minime şi pînă la diluţia respectivă. Pentru a înţelege mai bine această metodă, o vom ilustra printr-un exemplu: pentru determinarea D.L.$_{50}$ a unei tulpini de *Pasteurella multocida*, cultură în bulion de 24 ore, pentru şoarece, pe cale subcutanată, se aleg 40 de şoareci, de aproximativ aceeaşi vîrstă şi greutate şi se împart în 8 loturi de cîte 5 (tabelul 42).

TABELUL 42

Exemplu de consemnare a rezultatelor în vederea calculării D.L.$_{50}$

Nr. crt.	Diluţia	Numărul şoarecilor			Totaluri cumulative		Exprimare procentuală a morţilor
		inoculaţi	morţi	supravieţuitori	morţi	supravieţuitori	
1	10^{-1}	5	5	0	23	0	100 %
2	10^{-2}	5	5	0	18	0	100 %
3	10^{-3}	5	4	1	13	1	92 %
4	10^{-4}	5	4	1	9	2	80 %
5	10^{-5}	5	3	2	5	4	55 %
6	10^{-6}	5	2	3	2	7	22 %
7	10^{-7}	5	0	5	0	12	0 %
8	10^{-8}	5	0	5	0	17	0 %

Explicarea calculării totalurilor cumulative:

Coloana „morţi“:

— cifra 23 de la diluţia 10^{-1} reprezintă şoarecii morţi la diluţia respectivă plus şoarecii morţi de la toate diluţiile superioare (5+5+4+4+3+2);

— cifra 18 de la diluţia 10^{-2} reprezintă şoarecii morţi la diluţia respectivă plus şoarecii morţi de la toate diluţiile superioare (5+4+4+3+2) ş.a.m.d.

Coloana „supravieţuitori“:

— cifra 17 de la diluţia 10^{-8} reprezintă şoarecii supravieţuitori de la diluţia respectivă + şoarecii supravieţuitori de la toate diluţiile inferioare (5+5+3+2+1+1);

— cifra 12 de la diluţia 10^{-7} reprezintă şoarecii supravieţuitori de la diluţia respectivă + şoarecii supravieţuitori de la toate diluţiile inferioare (5+3+2+1+1).

Coloana „exprimare procentuală a morţilor“:

— procentul de şoareci morţi se raportează la suma de şoareci morţi + şoareci supravieţuitori (totaluri cumulative). Procentul 100 de la diluţia 10^{-1} rezultă din raportarea procentuală a cifrei 23 la 23+0. Procentul 100 de la diluţia 10^{-2} rezultă din raportarea procentuală a cifrei 18 la 18+0. Procentul 92 de la diluţia 10^{-3} rezultă din raportarea procentuală a cifrei 13 la 13+1 ş.a.m.d.

Din tabelul 42 rezultă că diluţia care ar produce mortalitatea a exact 50% din animalele inoculate se află situată undeva între diluţia 10^{-5} care omoară 55% din şoarecii inoculaţi şi 10^{-6} ce omoară 22% din şoarecii inoculaţi. Pentru a afla factorul de corecţie ce trebuie adunat la exponent, se aplică următoarea formulă:

$$\frac{(A-B)(C+D)}{2\,(AD-BC)},$$

în care:

A — este numărul şoarecilor morţi la diluţia imediat inferioară celei care ar fi omorît exact 50% — în cazul exemplului de faţă 5 (diluţia 10^{-5});

B — numărul şoarecilor care au supravieţuit la aceeaşi diluţie — în cazul nostru 4;

C — numărul şoarecilor morţi la diluţia imediat superioară celei care ar fi omorît exact 50% — în cazul nostru 2 (diluţia 10^{-6});

D — numărul şoarecilor care au supravieţuit la aceeaşi diluţie — în cazul nostru 7;

$$\frac{(5-4)\,(2+7)}{2\,(5\times 7-4\times 2)}=\frac{9}{54}=0{,}16$$

Rezultatul obţinut din acest calcul se adună la exponentul 5 şi reiese că diluţia care produce mortalitatea a 50% din animalele inoculate este $10^{-5,16}$.

ANIMALELE GERMFREE ŞI GNOTOBIOLOGIA

In afară de testarea patogenităţii pe animale crescute şi întreţinute în condiţii obişnuite de mediu pentru care s-a adoptat şi termenul de animale convenţionale, există astăzi posibiltăţi de experimentare pe animale sterile din punct de vedere microbiologic pentru desemnarea cărora termenul cel mai frecvent folosit este cel de „animale germfree". Acestea pot fi introduse în experiment ca atare sau contaminate intenţionat cu una sau mai multe specii microbiene cunoscute. Pentru acestea se utilizează termenii de animale „gnotobiote" sau „gnotoforice" (*gnotos* = cunoscut; *bios* = viaţă).

Tehnologia creşterii, fiziologia normală şi patologică, răspunsul animalelor gnotobiote la acţiunea diferiţilor factori de mediu (inclusiv a celor nocivi în rîndul cărora se încadrează şi microbii patogeni), constituie astăzi obiectul unei discipline de sine stătătoare numită gnotobiologie.

Creşterea animalelor germfree este foarte complicată, reclamă instalaţii şi aparatură costisitoare, personal specializat şi un înalt grad de tehnicitate.

În ţara noastră preocupările pentru această ramură a biologiei animale sînt în faza incipientă.

NORME GENERALE ALE CONDUITEI STABILIRII UNUI DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIC

Cînd se prezintă la laborator un cadavru, organ sau alt material patologic în vederea examenului bacteriologic, acesta se înscrie într-un registru, unde i se dă un număr

de ordine, după care se examinează. Dacă nu se examinează imediat, trebuie păstrat la frigider pînă în momentul examinării. În cadrul examenului bacteriologic este obligatorie respectarea următoarei succesiuni:

Examene executate direct din materialul patologic

În executarea diferitelor examene trebuie să se respecte următoarea ordine:

— Examenul anatomopatologic macroscopic al cadavrului sau organului. În multe cazuri, leziunea oferă puncte de reper prețioase, care pot orienta diagnosticul bacteriologic. În cazurile cînd există leziuni atipice, neconcludente, sau care par deosebit de interesante, se recoltează fragmente de organe în vederea examenului histopatologic.

— Examenul bacterioscopic direct: frotiurile se colorează prin metoda Gram. În unele cazuri, paralel cu metoda Gram se face și colorarea simplă cu albastru de metilen. În urma examenului bacterioscopic direct se poate stabili, în primul rînd, prezența sau absența unei bacterii în materialul patologic. În cazul prezenței acesteia pot fi observate următoarele caractere: forma germenilor; dimensiunile lor aproximative; modul de grupare, afinitatea tinctorială (grampozitivitatea sau negativitatea) și eventuale aspecte ale reacției organismului (procesul de fagocitoză).

În cazul cînd caracterele germenului implică posibilitatea prezenței unei capsule, se va face în continuare un frotiu, care se va colora prin metoda Giemsa. Cînd organele prezintă leziuni nodulare sau focare cu un conținut cazeos, se fac frotiuri care se colorează prin metoda Ziehl-Neelsen, pentru a pune în evidență eventuala prezență a bacilului tuberculozei.

— Paralel cu examenul bacterioscopic direct se fac însămînțări. Alegerea mediilor de cultură este condiționată

de rezultatele examinării frotiurilor. În cazul cînd aceste examene nu oferă nici un reper, se fac totdeauna însămînţări pe medii aerobe (bulion-agar) şi anaerobe (bulion cu carne-geloza Veillon), simple şi cu ser. Pentru bacilul tuberculozei, însămînţările se fac pe mediul Löwenstein.

Însămînţările se fac indiferent de rezultatul examenului bacterioscopic direct. Se poate întîmpla, ca în organ să fie un număr mic de germeni, care să nu apară în frotiu, dar care să se dezvolte pe mediile de cultură. Pe tuburile însămînţate se notează numărul de ordine din registru şi data, după care se incubează la termostat la 37°C. În afara acestor trei examene obligatorii mai sînt posibile următoarele probe de diagnostic din materialul patologic:

— Inoculări experimentale. În acest scop se fac broiaje din organele cele mai bogate în germeni şi se inoculează la speciile sensibile. Inoculările direct din materialul patologic prezintă importanţă mai ales în diagnosticul bolilor produse de bacterii sau rickettsii, care nu cresc pe medii de cultură inerte.

După executarea acestor probe, materialele patologice nu se aruncă, ci se păstrează la frigider pînă cînd se reuşeşte izolarea tulpinii microbiene.

Examene executate din culturi

În rare cazuri, examenul bacterioscopic direct din materialul patologic permite identificarea genului sau speciei bacteriene. De aceea se impune, în majoritatea cazurilor, necesitatea examinării germenului din culturi. Culturile se examinează, de regulă, la 24 ore de la însămînţare. În cazul cînd la 24 ore, mediile sînt încă sterile, se continuă observarea lor timp de 2—3 zile, după care se scot din observaţie şi se pun în găleata cu infecte.

Culturile se urmăresc mai mult timp, pentru că este posibil ca numărul de germeni, fiind mai mic, să necesite o perioadă de adaptare mai lungă, sau specia a cărei izolare și identificare se urmărește să aibă o viteză de creștere mai mică. Pentru bacilul tuberculozei, mediile sînt ținute sub observație timp de 2 luni.

La citirea rezultatelor însămînțărilor se pot sconta 3 posibilități:

— mediile să rămînă sterile, în care caz materialul patologic din care s-au făcut însămînțările se consideră bacteriologic steril;

— să crească pe medii o specie bacteriană în cultură pură. În acest caz s-a izolat o tulpină care urmează să fie identificată din punct de vedere al apartenenței de gen, specie și eventual biotip;

— să se obțină o cultură mixtă (un amestec bacterian). În acest caz urmează ca fiecare specie din amestec să fie obținută mai întîi în cultura pură, prin una din metode (mecanice, fizice, chimice, biologice, vezi pag. 260), care pare a fi cea mai indicată în situația concretă respectivă. O tulpină nu poate fi supusă examenelor de identificare înainte de a fi obținută în cultură pură.

Identificarea tulpinilor

După izolarea tulpinii sau tulpinilor bacteriene se procedează la identificarea acestora, respectînd următoarea ordine:

— Examenul aspectului cultural în medii lichide și solide.

— Examenul caracterelor morfologice din culturi. Din culturi pot fi cercetate în plus, caractere morfologice a căror observare nu este posibilă la examenul bacterioscopic direct din organe, și anume, prezența sau absența cili-

lor (se examinează, de regulă, din culturi tinere de 12—24 ore); prezența și caracterele sporului la speciile sporulate. Chiar la speciile care sporulează în organe, sporii sînt mai frecvenți și se examinează mai bine în frotiurile din culturi (*B. anthracis*-culturi pe agar de 24—72 ore, speciile din genul *Clostridium* — culturi în bulion cu carne de 24 ore—6 zile).

Uneori, examenul caracterelor morfologice și culturale este suficient pentru a identifica genul (*Staphylococcus, Streptococcus*) și în unele cazuri chiar și specia *Pseudomonas aeruginosa*), dar în majoritatea cazurilor este nevoie și de cercetarea altor caractere.

Dacă examenul caracterelor morfologice și culturale are un caracter minim și obligatoriu pentru identificarea oricărei tulpini bacteriene, celelalte grupe de caractere se examinează în funcție de genul și specia care sînt bănuite.

— Examenul caracterelor biochimice se face pentru identificarea majorității bacteriilor de formă alungită, Gram negative pentru diferențierea bacilului rujetului de *Listeria* (producția de H_2S, hemoliza) etc.

— Examenul caracterelor serologice se face pentru identificarea salmonelelor, a brucelelor etc.

— Examenul patogenității pentru animale de laborator prezintă, în general, importanță pentru majoritatea speciilor patogene. El se poate face atît direct din materialul patologic (cazul bacilului tuberculozei, al rickettsiilor), cît și din culturi (majoritatea speciilor bacteriene). Examenul patogenității se poate face fie sub aspect calitativ (tulpina inoculată produce sau nu produce infecția la o anumită specie de laborator), fie cantitativ (stabilind gradul de patogenitate pe baza determinării D.L.M. sau $D.L._{50}$.

Epuizarea tuturor acestor mijloace de investigaţie duce de multe ori, dar nu totdeauna, la stabilirea diagnosticului de gen sau specie.

În problema sistematicii bacteriene, predomină astăzi două puncte de vedere mai importante. Primul admite drept criteriu de bază pentru încadrarea unei bacterii într-o entitate taxonomică, existenţa unui număr cît mai mare de caractere comune. Pe această concepţie se bazează cea mai mare parte din sistemele de clasificare folosite astăzi. Al doilea punct de vedere, mai modern, care cîştigă din ce în ce mai mulţi adepţi şi care va duce foarte probabil în viitor la reconsiderarea mai multor entităţi taxonomice, se sprijină pe criterii genetice, mai ales pe existenţa unei similitudini în ce priveşte proporţia de guanină şi citozină din structura ADN.

Identificarea unui germen este de multe ori o operaţie foarte dificilă şi nu este posibilă numai pe baza folosirii unui ghid, cum este lucrarea de faţă şi nici chiar a unui manual. În acest caz se face apel la determinatoare. Printre determinatoarele cele mai frecvent întrebuinţate citäm: Bergey, 1957; Krasilnikov, 1949; Hauduroy, 1953 şi Prévot, 1961, în care sînt trecute toate genurile şi speciile studiate pînă în prezent, fie în ordinea unei sistematici botanice (Bergey, Krasilnikov, Prévot), fie în ordinea alfabetică (Hauduroy).

În cazul cînd specia izolată nu se încadrează în nici una din speciile trecute în determinatoare, se poate admite posibilitatea izolării unei specii noi, care poate fi descrisă. Încadrarea ei în sistematică nu se poate face însă decît în urma aprobării unui for internaţional (de regulă, Congresele de microbiologie). Pentru unele genuri şi specii microbiene există institute cu drepturi de centre internaţionale, care au competenţa rezolvării poziţiei în sistematică a unor tulpini, cum este cazul centrului internaţional pentru salmonele.

Diagnosticul se trece în registrul laboratorului la numărul sub care a fost înregistrată proba şi unde s-au trecut absolut toate datele anamnetice privind cazul, ca şi toate rezultatele investigaţiilor bacteriologice.

Fiecare tulpină este individualizată, fie printr-un număr, fie printr-un simbol. Numărul este totdeauna cel din registrul laboratorului. Simbolul poate fi numele animalului de la care s-a izolat tulpina sau numele localităţii, sau numai litera iniţială a acestora etc.

După stabilirea diagnosticului, tuburile cu tulpinile identificate care prezintă vreun interes deosebit se păstrează în colecţii bacteriene.

În ultimii ani, s-a adoptat uzanţa publicării de cataloage cu cele mai importante colecţii microbiene din lume.

INDEX ALFABETIC

A

Acetil-metil-carbinol, reacţie 288
Acidorezistenţa 155, 222
Actinobacillus equuli 85
„ lignieresii 83
„ mallei 86
Actinobaciloza 83
Actinomicoza 165
Actinomyces bovis 165
„ israelii 167
„ necrophorus 89
Aerobacter aerogenes 47
„ cloacae 47
Aeromonas punctata 34
Aerosaculită 180
Agalaxie contagioasă 180
Agar 237
„ cu azid sodiu 108, 240
„ cu ou 132, 240
„ cu sînge 237
„ cu sînge şi cristal violet 109
„ cu sulfatiazol 55
„ glicerinat 86, 93, 238
Agar hiperclorurat 101, 108, 241
„ moale 237, 270
„ PPLO 181, 251
Aglutinine 316
Aglutinogen 316
Albastru de metilen, colorare 218, 229
Albastru de toluidină, colorare 229
Alcool flambare, fixare 217
Alexina 329, 333
Amidon, hidroliza 280
Anaerostat 263
Andrade, indicator 279
Antibiograma 299
Antibiotice, sensibilitate bacterii 229
Anticomplementaritate 332
Antiseptice 304
Antrax 128
Apă peptonată 278
Arnold, cuptor 202
Ascoli, reacţia 130, 323
Autoclav Chamberland 204
Autoclavare 203

B

Bacillus anthracis 127
„ cereus 131
„ larvae 132
Bacilul botulinic 139
„ cărbunelui 127
„ cărbunelui bacteridian 127
„ cărbunelui enfizematos 142
„ cărbunelui simptomatic 142
„ Johne 163
„ Koch 154
„ Malassez Vignal 76
„ morvei 86
„ necrozei 89
„ rujetului 120
„ Schmorl 89
Bacteridia cărbunoasă 127
Bacterium necrophorum 89
Bacterium pseudotuberculosis rodentium 76
Bacterium viscosum equi 85
Baird Parker, mediu 100, 242
Bedsonia 193
Benzi antibiotice 302
„ hidrogen sulfurat 282
Berkefeld, filtru 206
Bordetella bronchioseptica 79
Borrelia anserina 171
Botulism 139
Bradsot 144
Braun (test KCN) 291
Braxy 144
Bronhopneumonie enzootică 118
Brown, scara nefelometrică 272
Brucella abortus 93
„ canis 93
„ melitensis 93
„ neotomae 93
„ ovis 93
„ suis 93
Bruceloza 93
Bulion cu ficat 251
„ cu sînge 238
„ cu ser 237
„ PPLO 181, 250
Burnet, test 95

C

CAMP, test 112, 293
Capsula, colorare 228
Cartof glicerinat 86, 93, 156, 238
Casares Gill, colorare 230
Catalaza, test 289
Cazeina, comportare bacterii 284
Cărbune bacteridian 127
Cărbune emfizematos 142
„ simptomatic 142
Chamberland autoclav 204
„ filtru 206
Chapman, mediu 100, 242
Cheratoconjunctivita bovină 88
Chlamydia psittaci (ornithosis) 194

Cili, colorare 230
Citrat de sodiu, mediu 291
Citrobacter freundii 46
Clostridium botulinum 139
„ chauvoei 142
„ histolyticum 152
„ novyi 146
„ oedematiens 146
„ oedematis maligni 144
„ perfringens 148
„ septicum 144
„ tetani 136
„ welchii 148
Coagulare lapte 284
Coagulare plasmă citratată 103, 293
Coagulator 205
Coagulază 103, 294
Coeficient fenolic 305
Colibacil 42
Colibaciloza 42
Coriza infecţioasă păsări 82
Corynebacterium equi 118
„ Kutscheri 118
„ ovis 118
„ pyogenes 116
„ renale 118
Cowdria ruminantium 192
Coxiella burneti 189
Cristal violet, agar cu sînge 109

D

Denitrificare, test 289
Dezinfectante 209, 305
Diagnostic diferenţial medii 243, 248
Difuzimetrică, metodă 300
Difuziune verticală 326
Diluţii, antibiograma 302
„ numărători bacterii 273
Diplococcus pluton 115
„ pneumoniae 114
DL_{50} 352
DLM 352
Doza minimă letală 352
Drigalsky, mediu 44, 59, 218
Durham, tub 280

E

Edward, mediu 241
Edemul malign (porc) 144
Ehrlich Böhme, reactiv 283
Ehrlichia bovis 192
„ canis 192
„ ovina 192
Elek, tehnica 327
E.M.B., mediu 44, 59, 243
Endo, mediu 44, 59, 248
Enterita hipertrofiantă 163
Enterococi 111
Enterotoxina 46, 105
Erwinia amylovora 52
Erysipelothrix insidiosa 120
„ rhusiopathiae 120
Escherichia coli 42
„ freundii 46

F

Febra Q 189
Fibrinolizina 104
Filtru Berkefeld 206
„ Chamberland 206
„ din sticlă 206
„ Seitz 206
Fixare frotiu 217
„ complementului, reacţie 329
Flambarea 202
Flotaţiei, metodă 155
Francisella tularensis 77
Frazier, mediu 286

G

Gangrena gazoasă 144
Gassner, mediu 249
Geloza glicero-glucozată 240
„ lactozată cu albastru bromtimol 248
„ lapte
„ Mac Conkey 244
„ VF 252
Geloza sînge 238
„ Veillon 253
Germ free, animale 363
Giemsa 228
Gnotobiologia 363
Godeuri, agar 301
Gram, metoda 219
Gurma 108

H

Haemophillus canis 82
„ cuniculi 82
„ gallinarum 82
„ influenzae 82
„ ovis 82
„ suis 80
Hansen, colorare spor 227
Hemoliza, test 292
Hemolizine, anticorpi 335
Henry, mediu 240
Hepatita necrotică, 146
Hialuronidaza 104, 112
Hidrogen sulfurat, test 282
Hidroliza amidonului 280
„ cazeinei 284
„ ureei 281
Hidropericardita 192
Hidropizia crapului 34
Hiss, mediu 279
Holera aviară 68
„ om 42
Hotis Miller, test 284

I

Imbogăţire, medii 245
Imunodifuzie 325
Indicator Andrade 279
Indol, reacţie 218

K

Kauffmann-Müller, mediu 245
KCN, test 291
Kitasato, balon 207
Klebsiella pneumoniae 48
Korthov, mediu 174, 250
Koster, metoda colorare 226
Kovacs, reactiv 283

L

Lapte turnesolat 284
Lecitinaza, test 287
Leifson, colorare 231
„ mediu 59, 247
Leptospira, genul 174
Leptospiroza 174
Levin, mediu 44, 243
Leucocidina 104
Lichefierea gelatinei 285
Lichefierea serului coagulat 287
Limfadenita cazeoasă 118
Limfangita ulceroasă 118
Limfogranulomatoza 194
Liofilizare 271
Listeria monocytogenes 123
Listerioza 123
Loca americană 132
„ europeană 115
Löwenstein, mediu 139, 239

M

Mac Farland, scară nefelometrică 272
Mac Conkey, mediu 244
Malonat de sodiu, test 291
Malleomyces mallei 86
Membrane filtrante 206
Micoplasmoza respiratorie 180
Microculturi, metoda 156
Micrometru ocular 232
„ obiectiv 232
Miyagawanella 194
Mobilitate 213, 214, 267
Moraxella bovis 88
Morva 86
Mycobacterium avium 154
„ bovis 154
„ microti (muris) 154
Monocitoza paratuberculosis 163
„ tuberculosis 154

N

Necrobaciloza 89
Necrobacterium necrophorum 89
Necrodermotoxina 104
Necropsie 352
Nefelometrică, metoda 272
Nitraţi, reducere 289
Nocardia asteroides 168

O

Oakley-Fulthorpe, tehnica 326
Orhiepididimita brucelică 93
Ornitoză 194
Ou, medii 239
Ouchterlony, tehnica 327
Oudin, tehnica 326
Oxidază, test 289

P

Pampana, test 95
Paracolobactrum orizonae 51
Pararickettsia 194
Pasteur, cuptor 202
» pipeta 216
Pasteurella anatipestifer 75
» animalium 68
» haemolytica 74
» multocida 68
» pseudotuberculosis 76
» septicemiae 75
» tularensis 77
Pasteureloza 68
Petroff, metoda 157
Peripneumonia contagioasă 180
Pfeifferella anatipestifer 75
» mallei 86
Picătura suspendată 294
Pielonefrita 118
Piobaciloza 116
Piocianina 32
Piosepticemia mînjilor 118
Plectiridium tetani 136
Pneumococ 114
P.P.L.O., medii 251
Precipitine 322
Precipitinogen 322
Proteolitice, proprietăţi 285
Proteus inconstans 54
» mirabilis 54
» morgani 54
» rettgeri 54
» vulgaris 54
Pseudomonas aeruginosa 30
» pyocyanea 30
Pseudomonoza 30
Pseudotuberculoza 76, 118
Psitacoza 194

R

Reducere, nitraţi 289
» substanţe colorante 288
R.F.C. 329
Rickettsia burneti 189
Roux, tub 238
Rujet 120

S

Saenz-Costil, metoda 157
Salmonella 57
Schmorl, bacilul lui 89
Seitz, filtru 206
Selenit acid de sodiu 246
Septicemie hemoragică 68

Seroaglutinare lentă 318
» lizã 176, 321
» rapidă pe lamă 316
Serofloculare 324
Seroneutralizare 345
Seroprecipitare 322
» Ascoli 323
» în gel 325
Serratia marcescens 53
SIM, mediu 294
Sphaerophorus necrophorus 89
Spirochaeta anserina 171
» gallinarum 171
Spirochetoza 171
SS, mediu 244
Stafilocoagulaza 103
Stamp, colorare 224
Staphylococcus aureus 100
» epidermidis 100
» pyogenes 100

T

Targnet, metoda 157
Tarrozi, mediu 251
Termostat 259
Tetanos 136
Tindalizare 204
Titrul aglutinant 317
Toxicitate, indice 306
Tuberculoza 154
Tularemia 77
Tuş de China 229

U

Uhlenhuth, mediul 250
Uree, hidroliză 281
Uree-indol, mediu 295

V

Veillon, geloza 253
Verde briliant, mediu 244
VF, mediu 251, 252
Vibrio bubulus 39
» cholerae 42
» coli 40
» comma 42
» fetus 36
Vibrio metschnikovii 40
» piscium 41
Vibrionul septic 144
Vibrioza 36
Vidal, reacţia 320
VL, mediu 252
Vogel-Johnson, mediu 243
Voges Proskauer, reacţia 288

W

Wassermann, tub 320
Weinberg, tub 253
Welchia perfringens 148
Wilson-Blair, mediu 246
Wright, reacţia 320

Y

Yersinia pseudotuberculosis 76
Yersin (tuberculoza tip) 161

Z

Ziehl-Neelsen 158, 222
Zonă, fenomen de 320

BIBLIOGRAFIE

Alton, G. G., Jones, L. M. *Laboratory techniques in brucelosis*. Roma, FAO Working Document. Anim. Hlth. Branch Monograph. FAO, 1964, nr. 7, 46 p.

Arvinti, L. M. *Cercetări asupra infecțiilor cu microorganisme din grupul PPLO (micoplasme) la păsări*. București, Teză doct., F. M.V., 1972

Baird Parcker, A. C. *An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci*. J. Appl. Bact., 1962, 25, 12.

Balș, M. *Antibioticele*. București, Ed. med., 1965, 468 p.

Băieș, I., Bran, L. *Bolile infecțioase ale animalelor domestice*. București, E.D.P., 1971, 686 p.

Bercea, I. *Leptospirozele animalelor domestice*. București, E.A.S., 1969, 181 p.

Bica Popii, V. *Patogenitatea a 60 tulpini de stafilococ pentru șobolan*. București, Comunic. Ses. șt. IANB, 1958, Text dactilografiat 7 p.

Bica Popii, V. *Corinebacterii și corinebacterioze la animale*. București, Teză doct., F.M.V., 1963, 349 p.

Bica Popii, V., Răducănescu, H. *Lucrări practice de Microbiologie și Imunologie Veterinară*. București, E.D.P., 1966, 218 p.

Bittner, J., Klein, R. *O nouă metodă de determinare a sensibilității față de antibiotice a germenilor anaerobi*. Rev. Igienă Microbiol. Epidemiol., 1952, *6*, 14.

Brandis, H., Smarda, J. *Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen. Im Infektionskrankheiten und ihr Erreger.* Jena, VEB, Gustav Fischer, Verlag 1971.

Breed, R. S., Murray, E. G. G., Smith, N. R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 7 th. Ed: Wiliams & Wilkins Co., Baltimore 1957, 1094 p.

Carol-Dumitriu, E. *Nocardioza generalizată la cîine.* Bucureşti, Comunicare Soc. Med. Vet., F.M.V., dec. 1972, Text dact. 5 pagini.

Cristea, I. *Studiu de laborator referitor la unele caracteristici ale tulpinilor de Pseudomonas aeruginosa izolate de la animale.* Bucureşti, Teză doct., F.M.V., 1971, 224 p.

Darie, P. *Cercetări privind L. monocytogenes şi listerioza la animal în R.S.R.*, Bucureşti, Teză doct. F.M.V., 1968, 272 p.

Davis, B. D., Dulbeco, R., Eisen, M. D., Ginsberg, S. H., Barry Wood, W. *Microbiology.* New York and London, Harper & Row Publ., 1967., 1464 p.

Dorobanţu, R. *Pasteurella multocida var. avium agent causal al unei mamite la oaie.* Comunic., Soc. Med. Vet., Bucureşti, 1972, Text dactilografiat 8 p.

Drăghici, D., Ungureanu, C. *Micoplasme şi micoplasmoze animale.* Bucureşti, CERES, 1972, 197 p.

Elias, E. *Izolarea germenului Vibrio de la păsări.* Bul. Fil. S.M.V., Bucureşti, 1971, *1*, 38.

Fallon, R. J. *Isolation Methods for Mycoplasmas from Man and Rodents.* În „Isolation methods for microbiologists" de Shapton and Bould G.W., London, and New York, Acad. Press, 1969, p. 42.

Feţeanu, A. *Contribuţii privind aplicarea tehnicii anticorpilor fluorescenţi şi radioactivi, pentru identificarea unor antigeni în organismul animal.* Bucureşti, Teză. doct., F.M.V., 1971 182 p.

Fievez, L. *Etude comparée des souches de Sphaerophorus necrophorus isolées chez l'homme et chez l'animal.* Bruxelles, Press Acad. Europ., 1963, 209 p.

Greceanu. A — *Cercetări privind metoda identificării grupului Escherichia izolat de la găini* (Gallus domesticus) Bucureşti, Teză doct. F.M.V. 1970, 149 p.

Harrigan, W. F., Mc Cance, M. E. *Laboratory Methods in Microbiology.* London-New York, Acad. Press, 1966.

Ieniştea, C. *Microbiologia alimentelor.* Bucureşti, Ed. med., 1958, 371 p.

Ieremia, T. *Diagnostic bacteriologic.* Bucureşti, I.M.F., 1967, 643 p.

Kolenko, E. I. *Praktikum po veterinarnoi mikrobiologhii.* Moskva, Selhozgizdat., 1963, 224 p.

Krasilnikov, N. A. *Opredeliteli bacterii i aktinomiţetov*. Moskva, Leningrad, Izdatelstvo Akademii Nauk S.S.S.R., 1949.
Kundrat, W. *Zur Differenzierung aerober Sporenbildner (Genus Bacillus Cohn)*. Zbl. Vet. Med., 1963, *10*, 5, 418.
Labinskaia, A. S. *Praktikum po mikrobiologhiceskim metodam issledovania*. Moskva, Medghiz, 1963, 464 p.
Linsert, H., Schimmel, D., Kielstein, P. *Bakteriologisch-serologishes laboratorium*. Leipzig, 1970, V. I—155 p., V.II—297 p.
Marica, D. *Cercetări asupra tulpinilor de Staphylococcus pyogenes var. ovis*. Bucureşti, Teză doct., F.M.V., 1971, 606 p.
Meitert, E. *Schéma de lysotypie pour Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Roum. Path. exp. Microbiol., 1965, *24*, 2, 439.
Merchant, I. A., Packer, R. A. *Veterinary bacteriology and virology*. Ames, Iowa, U.S.A., 1967, 752 p.
Mossel, D. A. A., Bechet, H., Lambion, R. *La prevention des infections et de toxi-infections alimentaires*. Bruxelles, C.E.P.I.A., 1962.
Moustardier, G. *Bacteriologie médicale*. Paris, Libr. Maloine S.A., 1968, 1094. p.
Munţiu, N. *Chimioterapia morvei cu sulfathiazol; acţiunea protectoare în infecţiile accidentale şi experimentale*. Rev. Med. Vet. Zoot., 1943, *54*, 145 şi 1948, *59*, 634.
Namioca, S. *Antigenic analysis of Pasteurella multocida*. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1970, 10, suppl. 97.
Nestorescu, N. *Bacteriologie medicală*. Bucureşti, Ed. med., 1961, 839 p.
Pimenova, M. N., Greciuşkina, N. N., Azova, L. G. *Rukovodsvo k prakticeskim zaneatiam po mikrobiologhii*. Moskva, Isd. Moskovskogo Univ., 1971.
Pohl, P., Thomas, J. *Revues des techniques simples d'isolement et d'identification des principaux germes anaerobies sporulés à Gram positif*. Ann. Med. Vét., 1966, 6, p. 150.
Pop, A. *Bruceloza animală*. Bucureşti, CERES, 1970. 218 p.
Popa, Al. *Bolile albinelor şi viermilor de mătase*. Bucureşti, E.A.S., 1965, 251 p.
Popa, G. *Lucrări practice de expertiză sanitar-veterinară*. Bucureşti, E.D.P., 1964, 232 p.
Popa, O. *Curs de microbiologie şi imunologie*. Timişoara, Lit. vol. I, 1969, 359 p.., vol. II, 1967, 335 p.
Popovici, I., Lazăr, I. *Research work on the zoopathogenic action of several species of bacteria from the Erwinia genus*. Rev. roum. de biol. ser. Zool., 1964, 6, 379.

Popovici, I., Stamatin, L., *Bolile infecțioase ale animalelor domestice*. București E.D.P., 1968, 726 p.

Popovici, I., Popoviciu, A. *Studiul tulpinilor de Pasteurella izolate de la păsări prin reacția de seroaglutinare directă*. Comunic. Ses. șt. IANB, București, 1971.

Popovici, V. *Contribuții la cunoașterea microorganismelor din genul Bedsonia (OPL, Miyagawanella, Pararickettsia) și a infecțiilor produse de acestea la animale*. București, Teză doct., F.M.V., 1966, 246 p.

Popoviciu, A. *Cercetări privind utilizarea profilactică a antibioticelor românești în bolile infecțioase ale păsărilor*. București, Teză doct., F.M.V., 1969, 381 p.

Prévot, A. R. *Traité de systématique bactérienne*. Paris, Dunod, 1961.

Răducănescu, H. *Actinomicoza și actinobaciloza. Studiu monografic și experimental*. București, Teză doct., F.M.V., 1962, 313 p.

Roșca, V. *Studii privind infecția listeriană (Listeria monocytogenes) la animale și om în zona centrală a Moldovei*. București, Teză doct., F.M.V., 1970, 343 p.

Rullier, J., Parodi, A. *Laboratoire et diagnostic en medicine vétérinaire*. Paris, Vigot Fr, .1968, 711 p.

Rusu, V., Bulandra, R., Rusu, I., Serbănescu, Al., Lăzăroae, D. *Nocardioza pulmonară generalizată cu considerații asupra valorii unor criterii de identificare pentru Nocardia asteroides. Microbiol. Parazitol. Epidemiol.*, 1970, *15*, 6, 505.

Săsărman, Al., Horodniceanu, T. *Influence de la temperature sur le developpement et la toxigènese de Clostridium perfringens*. Arch. Roum. Path. expér. et Microbiol., 1961, *20*, p. 691.

Săvulescu, M. *Frecvența bacilului de tip bovin în infecțiile tuberculoase la om*. București, Teză doct. F.M.V., 1969, 284 p.

Simionescu, E. *Contribuții la studiul spirochetozei aviare*. București, Teză doct., F.M.V., 1970, 110 p.

Skerman, V. B. D. *A guide to the identification of the Genera of Bacteria*. Baltimore, Williams & Wilkins Company, 1967.

Stamatin, E. *Studiul sensibilității la antibiotice a tulpinilor de Pasteurella multocida*. Lucrări științifice, IANB, 1971, 14, ser. C, p. 191—196.

Stamatin, N., Tacu, A., Marica, D. *Diferențierea în cadrul speciei Staphylococcus pyogenes a două variante, umană și ovină*. Anuar IPIA, 1949, *1*, 96.

Stamatin, N., Stoenescu, V., Taga, M. *Cercetări asupra pasteurelelor de origină animală. O nouă clasificare a acestor bacterii*. Anuar IPIA, 1950, *1*, 3.

Stamatin, N., Bica Popii, V., Răducănescu, H., Cristescu, P. *La pathogénité pour le pigeon el le hamster, test de distinction entre les types humains et ovins de Staphylococcus pyogenes*. VII Congrès Internat. Microbiol., Stockholm, Ed. Turevall, 1957, 362.

Stamatin, N., Anghelescu, S. *Patogenitatea speciei Bacillus cereus pentru șoareci pe cale nazală*. Congr. Nat. Microbiol. Medic. București, sept. 1965, 59.

Stamatin, N. *Microbiologie și imunologie veterinară*. București, E.D.P., 1965, 392 p.

Stamatin, N., Anghelescu, S. *Il test fagico nella tipizzazione dei ceppi* B. anthracis e B.cereus. Zooprofilassi, 1965, *20*, p. 177.

Stoenescu, V., Niculescu, A. *Bolile păsărilor*. Ed. a 2-a, Ed. Agro-Silvică, 1964, 328 p.

Țogoe, I., *Schemă pentru diagnosticul speciei Sphaerophorus necrophorus*. Com. Soc. Med. Vet. București, oct. 1972, text dact. 4 p.

Ungureanu, C., Grecianu, A. *Cercetarea unei tulpini de Cl. hystoliticum izolată de la un berbec cu edem al capului*. Probl. Epizoot. și Microb. IPIA, București, 1956, 4, 12.

Vasiu, C. *Cercetări asupra patogenezei și imunogenezei colibacilozei viteilor*. București, Teză doct., F.M.V., 1971, 164 p.

Vidal, G. *L'immuno-précipitation en milieu gelosé*. Revue Méd. Vét., 1968, *119*, 1, 45.

Volintir, V., Moga — Mînzat, R., Popescu, I., Panaitescu, S. *Identificarea unei enzootii de cheratoconjunctivită cu Moraxella bovis la tineretul taurin*. Rev. Zoot. Med. Vet., 1971, 10, 65.

Wilson, G. S., Miles, A. A. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*. Londra, Ed. Arnold publ., 1964, vol. I, 1105 p., vol. II, 2 331 p.

Wood, D. *Isolation of Listeria monocytogenes*. In „Isolation methods for microbiologists" de Shapton D.A. Gould G.W., London, New-York, 1969, 63.

Zarnea, G. *Microbiologie generală*. București, E.D.P., 1970, 675 p.

*** *Decretul nr. 167/1955 privind organizarea apărării sănătății animalelor. Regulamente și instrucțiuni pentru aplicarea lui*. București, E.A.S., 871 p.

*** *Laboratornîe metodî issledovania v veterinarii*. Moskva, Gosudarstvenoe izdatelstvo selskohozeastvenoi literaturî, vol. III, 1954.

*** *Salmoneloze. Rapoarte și comunicări prezentate în cadrul simpozioanelor și consfătuirilor în regiunea Dobrogea, Brașov și Banat*. Timișoara, Intrepr. Poligraf. Banat, 1967, 741 p.

*** *Rapports technique, Comité mixte FAO/OMS d'expertes de la brucellose*. Geneve, 1970, nr. 464.
*** *Handbuch der „Oxoid"*. Erzeugnisse für mikrobiologische Zwecke, London, 1972, 275 p.
*** *Mikrobiologisches Handbuch Trockennährböden, Nährbodengrundlagen und sonstige Präparate für die Mikrobiologie*. Darmstadt, Merck, 1972, 432 p.